Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. med. R. - E. Bader

Über die Stellung der Vi-Haemagglutination in der serologischen Typhusdiagnose

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Ludwig Ferdinand Kern

aus Kaiserslautern

1968

9746

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547605_0046

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. med. R. - E. Bader

Über die Stellung der Vi-Haemagglutination in der serologischen Typhusdiagnose

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Ludwig Ferdinand Kern
aus Kaiserslautern

1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr.med. W.Graumann
1. Berichterstatter:	Professor Dr.med. R.-E.Bader
2. Berichterstatter:	Professor Dr.med. G.Schmidt

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Material, Methodik, Vorversuche	14
III.	Ergebnisse	23
IV.	Besprechung der Ergebnisse	30
V.	Zusammenfassung	41
VI.	Literatur	43

I. E i n l e i t u n g

Seit der Entdeckung des Vi-Antigens bei S.typhi durch FELIX und PITT (1934) ist seine Bedeutung für die serologische Typhusdiagnose in zahlreichen Arbeiten hervorgehoben worden. Wenn die Untersuchung von Seren auf Vi-Agglutinine mit Hilfe von Vi-Antigenen noch nicht den erhofften Eingang in die diagnostische Methodik eines Typhuslaboratoriums gefunden hat, so sind dafür im wesentlichen die folgenden Gründe anzuführen.

Das Vi-Antigen - in der Form, in der es für die Bakterienagglutination, die Widal' Reaktion, benötigt wird - findet sich in der Kapselsubstanz der lebenden Typhusbakterienzelle. Aufschwemmungen lebender Typhuserreger bedeuten eine ernste Infektionsgefährdung, welche in der serologischen Diagnostik anderer Salmonellosen durch die Verwendung von Totantigen ausgeschlossen werden kann.

In wäßrigen Aufschwemmungen verliert die Bakterienzelle in der Regel das wasserlösliche Vi-Antigen. Während der Widal' Reaktion wird ein Teil der anwesenden homologen Antikörper durch das in Lösung gegangene Antigen - für das Auge unsichtbar - gebunden. Beide Vorgänge beeinflussen in unkontrollierbarer Weise die Bakterienagglutination und mindern somit ihren Aussagewert.

Das sich daraus ergebende Erfordernis von frischen Antigenpraeparationen durch tägliche Überimpfung und Aussaat von Typhuskolonien ist seinerseits von der folgenden Schwierigkeit begleitet. Die quantitative Ausstattung der Typhusbakterien mit Vi-Antigen unterliegt einem Formenwechsel, der von KAUFFMANN (1935) entdeckt und beschrieben wurde. Der von ihm so genannte VW-Formenwechsel besagt zweierlei: Von Überimpfung zu Überimpfung finden sich unterschiedliche Mengen von Vi-Antigen in den einzelnen Kolonien. Indessen beklagt man nicht allein die

quantitativen Schwankungen im Vi-Antigengehalt, sondern eine damit einhergehende weitere Erscheinung: Ist Vi-Antigen in ausreichender Menge vorhanden, so macht es die Typhusbakterienzelle gegenüber Typhus-O-Agglutininen inagglutinabel, es überdeckt gewissermaßen die übrigen Körperantigene. Der Verlust an Vi-Antigen gibt der Zelle ihre O-Agglutinabilität wieder, was sich bei der Beurteilung einer eingetretenen Agglutination als störend erweist; beide vom körnigen Typ unterscheiden sich O- und Vi-Agglutination nicht voneinander. Hinreichend reine und in quantitativer Hinsicht zufriedenstellende Vi-Antigenaufbereitungen werden also nur durch die sorgfältige serologische Prüfung und Auslese der weiter zu überimpfenden Kolonien gewährleistet. Hilfe brachte hier der Stamm 6S, Nr.61 der internationalen Salmonellenzentrale mit der Antigenformel: Vi:(d):-, ein reiner Vi-Stamm also, der jedoch nicht selten in seiner Rauhform vorliegt (was hier nicht Verlust des Antigens, sondern Spontanagglutination gegenüber iso- und hypertonischen Kochsalzlösungen bedeutet) und dann für serologische Untersuchungen unbrauchbar ist.

Der genannten Schwierigkeiten - Infektionsgefahr, tägliche Antigenpraeparationen und VW-Formenwechsel - wird man durch eine moderne serologische Untersuchungsmethode enthoben: durch die indirekte Haemagglutination. Literatur über diese und verwandte Reaktionen finden wir bei NETER (1956).

KEOGH, NORTH und WARBURTON (1947) gewannen aus der Aufschwemmung von H.influenzae in Kochsalzlösung eine Substanz, welche sich an rote Blutkörperchen anlagern ließ. Derartig markierte Erythrozyten werden in Gegenwart von H.influenzae-Immunserum agglutiniert. Ein Jahr später fanden sie (1948) weitere - unter anderem bei S.typhi - als Polysaccharide erkannte Antigene, welche durch ihre Anlagerung an Erythrozyten einen Komplex ergaben, der durch homologes Serum agglutiniert wurde.

Erste Veröffentlichungen über die Anlagerung von Vi-Antigen an Erythrozyten stammen aus dem Jahre 1951. In der Reihenfolge des Erscheinens ihrer Arbeiten waren es BIER (1951) in Frankreich, SPAUN (1951) in Dänemark und LANDY und WEBSTER (1952) in Nordamerika, die sich mit der Vi-Haemagglutination beschäftigten. Diese und alle folgenden Autoren, die über die Bestimmung von Vi-Agglutininen mit Hilfe der indirekten Haemagglutination berichten, stimmen darin überein, daß dieser serologischen Methode vor dem Bakterienwidal der Vorzug zu geben ist. Der einmal gewonnene Vi-Antigenextrakt ist bei geeigneter Lagerung in gleichbleibender Qualität monatelang haltbar; jede weitere Manipulation mit diesem Extrakt schließt eine Infektionsgefahr aus. Auf dem Wege zu einer Standardisierung der Widal' Reaktion und im Hinblick auf reproduzierbare Ergebnisse ist die Ausschaltung lebender Mikroorganismen, welche in ihrer Antigenausstattung naturgemäßen Wandlungen unterworfen sind, von Bedeutung. Die aufgrund der Antigen-Antikörperreaktion eingetretene Zusammenballung der roten Blutkörperchen zu häutchenartigen Agglutinaten erlaubt eine für das Auge leicht erkennbare und eindeutige Titerbestimmung.

Den entscheidenden Vorteil aber darf man in der Möglichkeit erblicken, ausschließlich das Vi-Antigen über die als Träger fungierenden Erythrozyten in die Reaktion einbringen zu können. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Vi-Antigens erlauben seine selektive Ablösung vom Bakterienleib und demzufolge seine alleinige Anheftung an Erythrozyten, wodurch der Untersucher in der Lage ist, mit einem solchen "Einfaktorenantigen" die aufgrund der spezifischen Rezeptorenanalyse eingetretene Agglutination als Reaktion zwischen Vi-Antigen und Vi-Antikörper zu determinieren, was ihm wegen des komplexen Antigenaufbaues der Bakterienzelle in Gegenwart eines an mannigfaltigen Agglutininen reichen Serums ohne weiteres nicht gestattet ist.

Unterschiedlichen Auffassungen begegnen wir hinsichtlich der Verfahrensweise und zwar bei der Auswahl der im wesentlichen drei Grundelemente der Methodik: Auswahl eines geeigneten Vi-Stammes, des Extraktionsverfahrens und der Erythrozyten.

Vi-Antigen findet sich zunächst bei fast allen, frisch von Typhuskranken isolierten Stämmen, ferner bei einigen Typhusvarianten, welche als Laborstämme dienen: (in Klammern vor dem Namen des Stammes die Nummer der internationalen Salmonellenzentrale) (59) S.typhi Ty2, 9,12,Vi:d:-, 1918 in Cherson von WEIL und FELIX (1920) isoliert, (60) S.typhi Watson, 9,12,Vi:d:-, (61) S.typhi 6S, Vi:(d):-, (62) S.typhi ViI, (9,12),Vi:(d):-, (BHATNAGAR et al., 1938), darüberhinaus aber auch bei anderen Bakterien aus der Gruppe der Enterobacteriaceae. KAUFFMANN (1935) entdeckte Vi-Antigen bei S.paratyphi C, (1940) bei der von ihm beschriebenen S.ballerup (heute Paracolobactrum oder Citrobacter ballerup) und schließlich bei einigen Colistämmen (1941), was ihn veranlasste, diesen den Namen Salmonella Coli 1 zu geben. (Diese zu verschiedenen Zeiten gefundenen und deshalb mit verschiedenen Nummern versehenen Colistämme gehören ihrer Antigenstruktur nach zu ein und derselben Art). Nachuntersuchungen von FELIX (1952), LONGFELLOW und LUIPPOLD (1943), LANDY,WEBSTER und SAGIN (1954) und WHITESIDE und BAKER (1959) bestätigten die immunologische Identität der bei den verschiedenen Enterobacteriaceae gefundenen Vi-Antigene, wenngleich auch Unterschiede bezüglich der mengenmäßigen Ausstattung und einiger physikalischer und chemischer Eigenschaften beschrieben wurden.

Bei der Auswahl eines dieser Bakterienstämme als Vi-Antigenlieferant spielen folgende Erwägungen eine Rolle. Sollen quantitative Kriterien berücksichtigt werden, so ergibt sich hinsichtlich der Menge des gebildeten Vi-Antigens eine Reihe mit E.coli 5396/38 an der Spitze, gefolgt von P.ballerup, S.typhi Ty2 und schließlich S.paratyphi C (East Africa).

Es stellt sich aber auch unter Berücksichtigung der Erfahrungen mit dem Bakterienwidal die Frage, ob nicht für die Bestimmung von Vi-Agglutininen in Seren von Typhuskranken oder Dauerausscheidern ein Stamm gewählt werden soll, der zwar Vi-Antigen besitzt, dessen weitere Körperantigene hingegen salmonellenfremd sind und dessen Vorkommen als Krankheitserreger so selten ist, daß eine störende Mitagglutination - von anderer Art als die der Vi-Agglutination - gemeinhin ausgeschlossen werden kann. Eine vorausgehende Absättigung der Seren mit den übrigen Typhus-Körperantigenen ließe sich dadurch vermeiden. In P.ballerup besitzen wir einen solchen Stamm.

Auf die Verhältnisse bei der indirekten Haemagglutination übertragen: Infolge ungeeigneter Extraktionsverfahren (unter anderem Erhitzung) gehen neben dem Vi-Antigen andere Körperantigene in Lösung, Vi- wird gemeinsam mit O-Antigenen an Erythrozyten gebunden, so daß hier ein unerwünschtes polyvalentes Antigen entsteht. Somit sollte bei der Vi-Antigenextraktion mit Hilfe von Hitze möglichst kein Typhusstamm, sondern allenfalls der Vi-Stamm P.ballerup Verwendung finden. Es soll jedoch nicht unerwähnt bleiben, daß CHU und HOYT (1954) auf Unterschiede zwischen Typhus-Vi- und Ballerup-Vi-Antigenen im Kreuzabsorptionstest hingewiesen haben, so daß sich für die indirekte Haemagglutination in der Typhusdiagnose Vi-Antigen aus den Typhusvarianten empfiehlt, jedoch gewonnen bei Zimmertemperatur.

In dem Bemühen, das Vi-Antigen in höchstmöglicher Reinheit, d.h. ohne Beimengungen anderer, als Antigen wirkender Substanzen, zu gewinnen, wurden Verfahren angestrebt, das vorwiegend aus D-Galaktosaminuronsäure bestehende Antigen (HEYNS und Mitarb., 1959) annähernd chemisch rein darzustellen. Dabei stellt sich das Problem, dieses Polysaccharid mit Hilfe verschiedener Lösungsmittel einerseits vollständig und andererseits als einziges aus der Zelloberfläche herauszulösen. Andere, chemisch ähnlich strukturierte Antigene aus der Zellwand dürfen sich nicht im Extraktionsgut finden. Im einzelnen wurde folgendermaßen verfahren:

BIER (1951) stellte einen Vi-Antigenextrakt nach der Methode von BOIVIN (1933) her (zit. bei GRABAR und CORVAZIER, 1951). Mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmte Kulturen des Stammes Watson werden mit dem gleichen Volumen 2-normaler Trichloressigsäure versetzt. Nach Abzentrifugieren der Keime wird der Überstand durch Dialyse konzentriert und das darin gelöste Antigen durch Alkohol ausgefällt. Auflösung in destilliertem Wasser und Ausfällung mit Alkohol werden wiederholt, das letzte Praezipitat in wenig destilliertem Wasser auf_elöst und als gut haltbares Antigen verwendet.

SPAUN (1951) tötet zunächst die gewachsenen Kulturen des Stammes ViI mit 75%-igem Alkohol ab, schwemmt das durch Zentrifugieren gewonnene Bakteriensediment in destilliertem Wasser auf. Das nach einigen Stunden in Lösung gegangene Vi-Antigen wird durch scharfes Abzentrifugieren von der Bakterienmasse getrennt. Der Überstand wird durch Zugabe von NaCl isotonisch gemacht und im Verhältnis 1:10 an Erythrozyten angelagert. Dieser Extrakt ist 4 Monate lang haltbar.
Ein Jahr später verfährt SPAUN (1952) wesentlich einfacher: ViI- und Ty2-Kulturen werden mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und 1 Stunde lang auf 100°C erhitzt. Nach scharfem Abzentrifugieren gewinnt er in Gestalt des Überstandes einen Extrakt, welcher, 10 Vol. Antigenauszug zu 1 Vol. gepackter Erythrozyten, angelagert wird.
Hiermit zeigt SPAUN in eindeutiger Weise, daß zum mindesten eine Eigenschaft des Vi-Antigens einer thermischen Behandlung widersteht: hinsichtlich seiner agglutininbindenden Eigenschaft ist das Vi-Antigen nicht thermolabil. Durch die Hitzebehandlung von Bakterienzellen abgelöst, entzieht es sich zwar dem Nachweis durch die Bakterienagglutination, in der indirekten Haemagglutination aber offenbart das Antigen seine volle Wirksamkeit. Schon PELUFFO (1941) stellte fest, daß für die sogenannte Thermolabilität die Hitzebehandlung w ä s s r i g e r Suspensionen verantwortlich zu machen sei, wohingegen dehydrierte Vihaltige Bakterien Hitzeeinwirkungen bis zu 150°C tolerierten und ihre Vi-Agglutinabilität und O-Inagglutinabilität im Bakterienwidal behielten. STUART und KENNEDY (1949) beobachteten am Bild eines Prozonenphaenomens die praezipitierende Wirkung des in Lösung gegangenen, hitzebehandelten Vi-Antigens. Auch berichten sie über die erfolgreiche Antikörperbildung im Kaninchen nach Injektionen des bakterienfreien, Vi-Antigenhaltigen Extrakts. FELIX (1952) überprüfte diese, seine bisherigen Ergebnisse widerlegenden Untersuchungen und stellte bei thermisch behandelten Kochsalzaufschwemmungen von verschiedenen Vi-Stämmen eine noch vorhandene, aber deutlich verminderte Vi-Agglutinabilität fest (mit Ausnahme des Stammes 6S, welcher selbst bei längerer Hitzeeinwirkung in dieser Hinsicht keine Abschwächung erfuhr). Die agglutininbindende Eigenschaft war ebenfalls beeinträchtigt, die agglutinogene Fähigkeit bakterienfreier Extrakte konnte hingegen nicht bestätigt werden. LANDY und WEBSTER (1952) und LANDY, WEBSTER und SAGIN erzielten mit hochgereinigten Vi-Extrakten beim Kaninchen nur schwache agglutinogene, im Mäuseschutztest jedoch gute immunisierende Wirkungen. WHITESIDE und BAKER (1959) fanden mit in gleicher Weise gereinigten Anti-

genen vergleichsweise minimale immunisierende Fähigkeit.

Doch nun zurück zu weiteren Extraktionsverfahren. LANDY und LAMB (1953) und WEBSTER, LANDY und FREEMAN (1952): Ausgangsmaterial für die Antigenextraktion sind Vi-haltige, azetongetrocknete Colibakterien des Stammes 5396/38. Aufgeschwemmt in physiologischer Kochsalzlösung (besser als in 0,1 normaler Salzsäure, wie bei LANDY 1952) geht Vi-Antigen in Lösung. Durch eine anschließende Kochsalz-(35%-ig) und Äthanol-(0,3-molar) Fraktionierung, gefolgt von einer milden Hydrolyse mit 1-normaler Essigsäure, sowie wiederholter Dialyse und Alkoholausfällung erhalten die Verfasser einen an Stickstoff armen Vi-Extrakt, welcher in zahlreichen Untersuchungen Verwendung findet. Unter anderem experimentieren LANDY, GAINES et al. (1954) und LANDY (1954) mit einer auf dieser Grundlage hergestellten Vaccine für den Menschen, deren Wirksamkeit mit Hilfe der Bakterienagglutination, der indirekten Haemagglutination und eines Praezipitationstestes nachgewiesen werden konnte.

CORVAZIER (1952) erntet 24 Stunden alte Kulturen von Ty2, ViI, S.paratyphi C und P.ballerup mit physiologischer Kochsalzlösung. Die zunächst abzentrifugierten Keime werden in frischer Salzlösung wiederaufgeschwemmt, das dabei in Lösung gehende Antigen findet sich nach Zentrifugieren im Überstand, welcher 1 Stunde lang auf 56°C erhitzt und anschließend formalinisiert wird. Nach Konzentration durch Dialyse und anschließendem Zentrifugieren - zur Elimination noch vorhandener Keime - erhält er seine "substance soluble".

Ähnlich schonend geht LE MINOR (1952) vor. Mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmte Kulturen von S.typhi, P.ballerup und von Coli 2624/36 werden 1 Stunde lang auf 56°C erhitzt und abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand gelangt in 20-facher Verdünnung zur Anlagerung an Blutkörperchen (2%-ige Suspension) und ist 4 Monate lang bei +4°C haltbar.

Dieser und alle anderen genannten Antigenextrakte erwiesen sich in der indirekten Haemagglutination als O-Antigenfrei.

Eine zweite Antigenpraeparation lieferte die gleichen Ergebnisse: Läßt man auf die Bakterienaufschwemmung 7 Tage lang eine Temperatur von 37°C einwirken, so löst sich Vi-Antigen in dem gewünschten Ausmaße. In ihren Eigenschaften in der indirekten Haemagglutination sind die Antigenaufbereitungen LE MINOR's und CORVAZIER's gleichzusetzen.

An dieser Stelle verdient eine Beobachtung CORVAZIER's (1952) Beachtung: Die Erhitzung einer Bakterienaufschwemmung des Stammes Watson für 10 min. auf 90°C führte zu einer Lösung, welche, an Erythrozyten angelagert, diese zur Agglutination gegen Vi- und O-Seren befähigte. Die 10 min. lange Erhitzung auf nur 80°C läßt dies vermissen, die beladenen Blutkörperchen sind Vi-agglutinabel und O-inagglutinabel. Das im Watsonstamm vorkommende, bei Vorliegen in V-Form in der Bakterienagglutination aber unbeteiligte, gleichsam verdeckte somatische Antigen geht bei

der stärkeren thermischen Behandlung in Lösung und damit in adsorptive Bindung an rote Blutkörperchen. O- und Vi-Antigene nebeneinander ergeben - so CORVAZIER - positive O- und Vi-Haemagglutinationen. Die Beschreibung dieses Phaenomens kontrastiert mit den Beobachtungen von SPAUN (1952), LANDY und CEPPELINI (1955) und BOKKENHEUSER et al. (1962). In Analogie zu den Verhältnissen bei der lebenden Bakterienzelle konnten diese Autoren feststellen, daß simultan an Erythrozyten angelagerte O- und Vi-Antigene (SPAUN: nur bei Überschuß an Vi-Antigen, LANDY und CEPPELINI: auch bei hintereinander folgender Anlagerung in der Reihenfolge: Vi-O, BOKKENHEUSER: auch in der Latexagglutination) ausschließlich zu einer Vi-Agglutination führen, eine Agglutination gegen O-Antikörper aber nicht eintritt. Gleichwohl sollen derartig beladene Erythrozyten O-Antikörper aus einem Serum absorbieren können (BOKKENHEUSER). Die nacheinander erfolgende Anlagerung von Vi-und O-Antigenen durch LANDY beweist, daß hier das somatische Antigen nicht einfach "unter" dem Vi-Antigen sich einer serologischen Reaktion entzieht, sondern daß sterisch-molekulare Gegebenheiten aufseiten der Zelloberfläche oder des Vi-Antigens eine Rolle spielen. Sollte also in der Tat eine Depression der O-Agglutinabilität durch die gleichzeitige Anwesenheit von Vi- und O-Antigen vorliegen, so ist es in der Vi-Antigenaufbereitung ohne weiteres gestattet, Bakteriensuspensionen einer eingreifenden thermischen Behandlung zu unterziehen. Ungewollt in Lösung gegangene somatische Antigene von sogenannten reinen Vi-Stämmen würden dann nicht störend in Erscheinung treten. Stellt man aber die Ergebnisse CORVAZIER's in Rechnung, so empfiehlt sich auf jeden Fall ein schonendes Vorgehen in der Gewinnung von gelöstem Vi-Antigen.

CHU und HOYT (1954) suspendierten 24 Stunden alte Kulturen von ViI, Ty2, Watson und P.ballerup in 1-normaler Salzsäure und neutralisierten die Aufschwemmung nach zweimaligem Gefrieren und Wiederauftauen mit 1-normaler Natronlauge. Der durch Zentrifugieren gewonnene und an Kaninchenerythrozyten angelagerte Überstand wurde in dieser Weise zu einem Vollantigen kompletiert und zum Zweck der Vi-Antikörperbildung in Kaninchen injiziert. Auffallend war, daß Kaninchen, welche nur mit dem Extrakt (aus ViI) immunisiert worden waren, zwar wenig Vi-Antikörper gebildet hatten, dafür aber umso mehr O-Antikörper; letzteres war nach der Immunisierung mit Vi-beladenen Erythrozyten nicht der Fall gewesen. Der Versuch, Vi-Antigen mit absolutem Alkohol zu extrahieren und anzulagern, mißlang.

SCHUBERT et al. (1959) schwemmten Ballerupbakterien mit physiologischer Kochsalzlösung ab und erhitzten die Suspension 1 Stunde lang auf 100°C im Dampftopf. Der nach Zentrifugieren vom Bakteriensediment getrennte Überstand erwies sich als sehr wirksamer Extrakt - er vermochte in der Verdünnung von 1:400 Hammelerythrozyten zu sensibilisieren - und war nach Zugabe von Merthiolat (0,1 mg/ml) bei +4°C lange lagerungsfähig. Allerdings zeigte sich nach der Hitzebehandlung eine minimale O-Haemagglutination gegen Ballerup-O-Serum, was jedoch für die Typhusdiagnose kaum eine Rolle spielen dürfte.

Zwei unterschiedliche Extraktionsverfahren durch TOMASIC et al. (1953) führten zu serologisch-qualitativ gleichen Ergebnissen. Vil- und Ballerupkeime waren das Ausgangsmaterial. Einmal wurde die Ablösung des Vi-Antigens durch die proteolytische Andauung lebender Keime erreicht, gefolgt von Konzentration durch Dialyse, Ausfällung durch Azeton und Trocknung im Vakuum, das andere Mal wurden die Keime erst durch Azeton und Alkohol-Aether eines Großteils ihrer Lipoide beraubt und danach mit Glaspuder aufgerieben. Das freiwerdende Vi-Antigen löste sich in molarer Kochsalzlösung, Proteine wurden am isoelektrischen Punkt entfernt, nach mehrfacher Reinigung konnte der an Stickstoff arme Extrakt mit Azeton ausgefällt und im Vakuum getrocknet werden. In einer Verdünnung von 1:3000 wurden diese Auszüge an Meerschweinchenerythrozyten angelagert.

Über die berichteten Verfahren hinaus, welche alle die Extraktion von Vi-Antigen, geeignet zur Anlagerung an Erythrozyten, zum Ziele hatten, wurden Methoden bekannt, Vi-Antigen für andere serologische Teste möglichst rein darzustellen. BAKER, WHITESIDE und Mitarb. (1959) stellten für den Agar-Diffusion-Praezipitin-Test nach Ouchterlony ein Antigen her, welches mit Rücksicht auf die weitgehende Erhaltung der Molekülverbände und der serologisch wirksamen Azetylseitenketten unter Vermeidung von Hitze und Essigsäure extrahiert wurde. (Siehe auch LANDY et al. (1961) und STAUB 1964). Die Forschergruppe um WESTPHAL hat sich vor allem in Zusammenarbeit mit KAUFFMANN um die chemische Analyse der Salmonellen-O-Antigene verdient gemacht. Ausgangsverfahren zur Gewinnung ihrer hochgereinigten Polysaccharidextrakte ist die Trennung von Polysacchariden und Eiweißkörpern mit Hilfe von Phenol/Wasser-Mischungen. Das Vi-Antigen ist als Polymer von N-azetylierten D-galaktosaminuronsäuren den Oligosacchariden der O-Antigene, welche eher aus der Zellwand stammen, verwandt. Wir werden im Kapitel Methodik näher auf dieses Verfahren eingehen.

Die Ergebnisse der genannten Autoren mit den mehr oder weniger gereinigten Antigenfraktionen lassen erkennen, daß der gelegentlich betriebene Aufwand nicht immer in dem direkten und günstigen Verhältnis zu der erhofften höheren Praezision im serologischen Test steht. Wenn sich auch eine als Antigen wirksame Substanz chemisch analysieren läßt, ja unter Umständen diese als Reinsubstanz Eingang in eine serologisch Reaktion finden kann, so bedeutet das nicht, daß erst hiermit ein Maximum an serologischer Exaktheit erreicht sei. Letzte und einzige Prüfinstanz für den Wert eines Extraktionsverfahrens und damit des neuen Werkzeuges ist der serologische Test, in unserem Fall die indirekte Haemagglutination.

Das letzte zu besprechende Element der Methodik sind die Blutkörperchen. In der Literatur begegnen wir am häufigsten den Erythrozyten von Hammel und Mensch. Beide eignen sich ohne weitere Vorbehandlung gleichermaßen als inerte Partikel zur Anlagerung von gelösten Lipopolysacchariden. Hammelblutkörperchen stehen jedem größeren medizinischen Untersuchungslaboratorium in ausreichender Menge zur Verfügung, nur ist zu bedenken, daß nicht wenige der zu untersuchenden Humanseren Heteroagglutinine vom FORSSMANN-Typ gegen Hammelerythrozyten beherbergen und dadurch eine der Reaktion parallellaufende Kontrolle notwendig wird. SCHUBERT und Mitarb. (1959) sind deshalb gezwungen worden, von einigen hundert untersuchten Seren 57 vor der Haemagglutinationsreaktion mit Hammelerythrozyten abzusättigen. Aus diesem Grunde wählt die Mehrzahl der Autoren Humanerythrozyten der Blutgruppe O, deren Beschaffung über eine Blutbank zwar etwas schwieriger ist, gegen die aber im Humanserum keine Antikörper existieren. Eine Kontrolle sollte aber auch hier mitgeführt werden. BOKKENHEUSER und Mitarb. (1962) prüften in einer neueren Arbeit die adsorptiven Eigenschaften von Blutkörperchen des Menschen, des Hammels und der Gans, ferner von Rind und Alligator. Erst die Vorbehandlung mit proteolytischen Fermenten machte die letzteren zu einem geeigneten Instrument in der indirekten Haemagglutination. Mit Antigenen beladene Erythrozyten fallen bei längerer Lagerung in etwa der gleichen Weise der Haemolyse anheim, wie unbeladene. Die Behandlung mit Formalin soll die Blutzellen haemolyseresistenter machen. Von Interesse ist die Möglichkeit, mit Choriongonadotropin beladene Hammelerythrozyten zu lyophilisieren, wodurch diese jahrelang haltbar werden und jederzeit für den sogenannten Pregnosticontest, eine Haemagglutinations-Hemmungs-Reaktion in der immunologischen Schwangerschaftsdiagnose, zur Verfügung stehen. (BAUMGARTEN, 1964). Die meisten Untersucher verwenden jedoch im Hinblick auf die Haemolysegefährdung möglichst frische Erythrozytensuspensionen.

Worin liegt nun die Bedeutung der Feststellung von Typhus-Vi-Antikörpern beim Menschen?
Die Entdeckung des Vi-Antigens durch FELIX (1934) fiel in eine Zeit, in der, Folge des ersten Weltkrieges, noch weitaus größere Teile der Bevölkerung gegen Typhus geimpft waren als heute. Viele Untersucher waren in der serologischen Typhusdiagnose vor die schwierig zu entscheidende Frage nach der Herkunft der gefundenen Typhusantikörper gestellt: Akute Erkrankung, Dauerausscheider oder aktive Immunisierung. BADER (1940) wies einen Ausweg aus dem Dilemma, indem er das Vorkommen von O-Antikörpern, mit geringen Ausnahmen, einer typhösen Erkrankung zuschrieb, H-Antikörper hingegen bei beiden, Erkrankten und Geimpften gleichermaßen beobachtete. Nach dem Erscheinen des Vi-Antigens in der Typhusserologie fanden sich bald Hinweise auf die begrüßenswerte Tatsache, daß die nach Schutzimpfungen auftretenden Vi-Antikörper schon nach verhältnismäßig kurzer Zeit, nach Wochen und Monaten, auf einen mit der Widal' Reaktion nicht mehr faßbaren Titer zurückgingen, während Dauerausscheider und frisch Erkrankte diesen Antikörper in signifikant höherem Maße besaßen. Die Arbeiten von FELIX, KRIKORIAN und REITLER (1935) sowie von BHATNAGAR (1938) und BHATNAGAR et al. (1938) ermutigten viele Forscher, sich in der Differentialdiagnose zwischen Krankheit und Schutzimpfung des Vi-Antigens und seines korrespondierenden Antikörpers zu bedienen. Die folgenden Arbeiten sollen erwähnt werden: GIONAVARDI (1937), PIJPER und CROCKER (1937), HABS (1940), ELIOT (1941), RAMMLER (1943), KNAPP (1948), RISCHE (1950), FELIX (1950), WILDFÜHR (1951), ANDO und SHIMOJO (1953) und MÖBIUS (1955). Die Weiterführung dieser Untersuchungen mit der Methode der indirekten Haemagglutination finden wir bei LANDY und LAMB (1953) und STAACK und SPAUN (1953), Ein besonderes Interesse im Hinblick auf die viel häufigeren und umfassenderen Impfaktionen in osteuropäischen Ländern verdienen die Arbeiten von HAVLIK und POZUZNIK (1961) und KOPACKA et al. (1961), welche die Vi-Serodiagnostik als wertvolle Bereicherung, vor allem bei der Feststellung von Dauerausscheidern

betrachten. In beiden Veröffentlichungen werden parallellaufende Untersuchungen mit Bakterienagglutination und Haemagglutination gezeigt. Zwei aus etwa dem gleichen Zeitraum stammende Arbeiten von SCHUBERT et al. (1959) und dem Public Health Laboratory Service, England (Report of the P.H.L.S. 1961) forderten aufgrund ihrer außerordentlich günstig erscheinenden Ergebnisse die kritische Stellungnahme und Nachuntersuchung durch ANDERSON (1960) und BOKKENHEUSER (1964) heraus. Im Gegensatz zu SCHUBERT et al., welche mit der indirekten Haemagglutination - sie wählten Ballerup-Vi beladene Hammelblutkörperchen - unter einer größeren Anzahl von Dauerausscheidern in über 90% positive Vi-Titer fanden und, was das Ergebnis noch bestechender erscheinen ließ, unter etwa 200 Normalseren keine einzige Vi-Haemagglutination verzeichnen mußten, berichtete ANDERSON von einer 20%-igen Quote positiver Ergebnisse bei der Prüfung von 300 Normalseren mit der gleichen Methode. Durch Absorption und Neutralisation der Vi-positiven Normalseren mit Vi-Antigen konnte der die positiven Reaktionen herbeiführende Antikörper nicht eliminiert werden, was den Autor annehmen ließ, daß es sich bei dem angelagerten Extrakt möglicherweise um ein Gemisch von mehreren Antigenen handelte, von denen ein beträchtlicher Teil nichts mit Vi-Antigen zu tun hätte.

Mit einem Rechenexempel entwertete BOKKENHEUSER die Ergebnisse all der Untersuchungen über den Vi-Bakterien-Widal, sofern diese die Entdeckung von Dauerausscheidern zum Ziele hatten. Bei Zugrundelegung der Zahlenwerte des P.H.L.S.-Reports rückte er die Angaben: 71,5% positive Vi-Reaktionen bei bekannten Keimträgern gegenüber 1,17% positiven Vi-Reaktionen bei bakteriologisch typhus-negativen Kontrollpersonen in ein neues Licht. Die verhältnismäßig kleine Anzahl von 1,17% bedeutet bei Annahme von einem Dauerausscheider auf 100 000 Normalpersonen in England, daß sich hinter etwa 1500 Vi-positiven Seren nur ein einziger Dauerausscheider verbirgt, oder mit an-

deren Worten: 99,93% der gefundenen Vi-Titer stammen von Normalpersonen ohne Typhusinfektion. Daraus folgert der Autor, daß der Suche nach Vi-Antikörpern bei Typhuskeimträgern nur dann ein vertretbares Maß an Erfolg beschieden sei, wenn der Kreis der untersuchten Seren durch einen begründeten Verdacht möglichst klein gehalten werde.

Die zuletzt erwähnten Veröffentlichungen setzen hinter die zuweilen recht optimistische Beurteilung der Brauchbarkeit der indirekten Haemagglutination als Mittel zur Erfassung von Dauerausscheidern ein Fragezeichen. Ob, von der Erfassung von Dauerausscheidern abgesehen, die Vi-Haemagglutination zum wenigsten als Bereicherung der Typhusserodiagnostik angesehen werden kann, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Diese Frage kann bejaht werden, wenn sich zeigt, daß im Vorkommen von positiven Vi-Haemagglutinationsreaktionen ein signifikanter Unterschied besteht zwischen zwei Serumkollektiven, von denen das eine durch das Vorhandensein von Typhus O- und/oder Typhus H-Agglutininen, das andere durch das Fehlen von Typhus O- und H-Agglutininen gekennzeichnet ist. Kann man also in dem Nachweis von Vi-Haemagglutininen eine Komplettierung der bisher üblichen serologischen Typhusuntersuchung erblicken, kann man eine deutlichere Abgrenzung zu Seren ohne Typhus O- und H-Agglutininen erreichen und kann man damit der Typhusdiagnose ein weiteres nützliches Element hinzufügen ?

II. Material, Methodik, Vorversuche

Untersuchungsobjekte waren 100 Humanseren (künftig als Gruppe I bezeichnet), die in der einige Wochen zuvor im Typhuslaboratorium angestellten Widal-Untersuchung einen Typhus-O-Titer höher als 1:50, einen Typhus-H-Titer höher als 1:100, oder beides erreicht hatten und 50 Humanseren (künftig als Gruppe II bezeichnet), die in der Untersuchung auf verschiedene Salmonellenagglutinine weder einen O- noch H-Titer erreicht hatten.

Jedes dieser Seren wurde inaktiviert und in parallellaufenden Arbeitsgängen erneut auf seinen Gehalt an O-Agglutininen und nun auch Vi-Agglutininen sowie ferner auf seinen Gehalt an O- und Vi-Haemagglutininen untersucht. Alle Seren wurden mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, die vorgelegte geometrische Verdünnungsreihe eines jeden Serums - von 1:6,25 bis 1:800 - in vier Reihen unterteilt. Ausgehend von einer Menge von 2 ml in einer jeden Verdünnungsstufe führte die Unterteilung zu 4 mal 0,5 ml, sodaß ein jedes von vier Röhrchen einer Verdünnungsstufe die gleiche Menge Antikörpereinheiten enthielt.

Für die Bakterienagglutination (O-Widal) wurden 0,5 ml einer mit dem unbegeißelten Typhusstamm O-901 (9,12:-:-) beimpften Nährbouillon auf 1%-igem Nähragar in 5 Drigalski-Schalen ausgespatelt und etwa 24 Std bei 37°C bebrütet. Die Abschwemmung des Bakterienrasens einer jeden Schale mit physiologischer Kochsalzlösung ergab etwa 25 ml einer dichten Bakteriensuspension. Die Abtötung der Keime erfolgte durch Hinzugabe des gleichen Volumens reinen absoluten Alkohols. Im Eisschrank aufbewahrt war dies die Stammsuspension für die Widal' Reaktion. Auf das etwa 100-fache verdünnt, wurden jeweils 0,5 ml der opaleszierenden Bakterienaufschwemmung der gleichen Menge der vorliegenden Serum-

verdünnung hinzugefügt. Die Reaktionen liefen in sogenannten Widalröhrchen ab, deren Kuppen in ein 52°C warmes Wasserbad eintauchten. Abgelesen wurde am folgenden Tage, ohne Benutzung eines Agglutinoskopes. Wir unterschieden zwischen +++ -, ++ -positiven und negativen Reaktionen. Die durch die allgemeine Praxis vorgezeichnete Technik erübrigte besondere Vorversuche; es wurde lediglich die serologische Zuverlässigkeit des Antigens geprüft, was im übrigen bei jedem neuen Untersuchungsgang in Gestalt einer mitgeführten Kontrolle wiederholt wurde.

Für die Bakterienagglutination (Vi-Widal) wählten wir aus Gründen der Vermeidung von möglicherweise auftretenden, störenden Typhus-O-Agglutinationen durch nicht reine Typhus-Vi-Stämme den Ballerup-Vi-Stamm , Nr. 107 der internationalen Salmonellenzentrale.

Ballerup-Keime der V-Form wurden nach sorgfältiger optischer und serologischer Auswahl in etwas Nährbouillon suspendiert, auf 1%-igen Nähragar in 4 Drigalski-Schalen ausgespatelt und nach 24-stündigem Wachstum bei 37°C mit je 6 ml physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt. Die gewonnenen 20 ml der dichten Bakteriensuspension wurden in 20 gleichgroße Portionen à 1 ml in ebensoviele Reagenzröhrchen abgefüllt, welche analog der Gewinnung von in der Widal' Reaktion körnig reagierendem Pasteurellenantigen (BADER, unveröffentlicht) eingefroren bei -40°C aufbewahrt wurden. Am Untersuchungstage wurde der Tiefgefriertruhe ein Röhrchen entnommen, dessen Inhalt bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in geeigneter Gebrauchsverdünnung zu gleichen Teilen auf die vorliegenden Serumverdünnungen überpipettiert wurde. Das Antigen-Serumgemisch wurde in Widalröhrchen bei 52°C im Wasserbad nur 10 min inkubiert und anschließend 5 min bei 3000 U/min, wie bei WAGNER und ZDENKA (1963) angegeben, zentrifugiert. Nach leichtem Anschlagen der Röhrchen löste sich im positiven Falle, ähnlich der O-Agglutination, ein körniger Niederschlag vom Boden, welcher auch nach längerem Schütteln nicht

verschwand und ein eindeutiges Ablesen des Titers erlaubte. Zu protokoll genommen wurden auch hier +++ -, ++ -positive und negative Reaktionen.

Erst dieses Verfahren führte zu den erwünschten körnigen Agglutinaten, wohingegen wir bei Anwendung der üblichen Vi-Widaltechnik mit Ballerupsuspensionen nur schleimig-fädige Agglutinate erhielten, welche noch dazu gelegentlich in Kochsalzkontrollen und, nach längerem Stehen der Teströhrchen, auch in höheren Serumverdünnungen auftraten. Dieser Agglutinationstyp war von der Salmonellen-H-Agglutination verschieden; nach Schütteln blieb das kleine flockige Agglutinat weitgehend erhalten. Die Tabelle 1 zeigt einen der entscheidenden Vorversuche.

Tabelle 1. Gegenüberstellung der Reaktionsweisen zweier Ballerup-Vi-Antigene im Vi-Widal: 1.) Aufschwemmungen lebender Keime, 2.) Aufschwemmungen der Keime nach Tiefgefrieren, unter verschiedenen Inkubationsbedingungen

		Antigen: Ballerup St.107, lebend					
Serum: Ty-Vi 1741 [1]	1:	200	400	800	1600	3200	NaCl
Inkub. 10' 22°C, zentr.		+++	++	-	-	-	
10' 52°C, zentr.		+++	++	-	-	-	-
10' 52°C		-	-	-	-	-	
8^h 52°C, zentr.		$+++^{s2)}$	$+++^{s}$	$+++^{s}$	$++^{s}$	-	
8^h 52°C		$+++^{s}$	$+++^{s}$	$++^{s}$	-	-	
		Antigen: Ballerup St.107, gefroren					
10' 22°C, zentr.		+++	++	++	-	-	
10' 52°C, zentr.		+++	+++	+++	-	-	-
10' 52°C		-	-	-	-	-	
8^h 52°C, zentr.		$+++^{s}$	$+++^{s}$	$++^{s}$	-	-	
8^h 52°C		$++^{s}$	-	-	-	-	
Serum: S.enter. 0-9	1:	25	50	100	200	400	
10' 52°C, zentr.		-	-	-	-	-	

1) Serum des Robert-Koch-Inst. Berlin, Aggl.-Titer 1:800
2) $+++^{s}$: schleimig-fädige Agglutinate

Das Tiefgefrieren der Bakterienaufschwemmung erschwert einerseits die unerwünschte Ablösung des Vi-Antigens von der Zelloberfläche, andererseits bewirkt es, daß die Untersuchungen an verschiedenen Tagen unter den geforderten gleichen Bedingungen durchgeführt werden können.

Wiederholte Versuche zur Herstellung einer stabilen Typhus-Vi-Bakterienaufschwemmung nach ANDO und SHIMOJO (1953) und MÖBIUS (1955) scheiterten sowohl unter der Verwendung des Stammes 6 S wie auch des Stammes 965 Rauss (freundlicherweise von Frau Dr. MÖBIUS, Leipzig, überlassen) an der Labilität der in einer CaCl-Lösung suspendierten Keime; nach wenigen Stunden fielen körnige Niederschläge aus.

Tabelle 2. Hammel- und Humanerythrozyten in der Prüfung von Humanseren mit Hilfe der indirekten Haemagglutination

Antigen: Ty-O, Extrakt

Seren 1:	Hammelerythrozyten						Humanerythrozyten					
	25	50	100	200	400	NaCl	25	50	100	200	400	NaCl
4817	◔	◕	◕	○	○	○	◔	○	○			○
5122	◔	◕	◕	○	○		◔	◕	○	○		
14971	●	◔	◔	◔	◔		◔	◔	◔	◔	◕	
16320	●	●	●	◔	◔		●	●	◔	◔	◔	
Ty O-9	◔						◔					

Unbeladene Erythrozyten

	Hammelerythrozyten						Humanerythrozyten					
4817	◔	◕	◕	○	○		○	○				
5122	◔	◕	◕	○	○		○	○				
14971	◕	○	○				○	○				
16320	◔	◕	○	○			○	○				
Ty O-9	○						○					

● = ++++ , ◔ = +++ , ◔ = ++ , ◕ = + , ○ = negativ

Für die indirekte Haemagglutination (O-Haemagglutination) war das Ausgangsmaterial für die Antigenextraktion die gleiche, dichte salinische Aufschwemmung von Keimen des Stammes O-901, wie wir sie bereits bei der Herstellung des O-Antigens für den Bakterienwidal beschrieben hatten. Diese wurde im Autoklaven 1 Std auf 120°C erhitzt und anschließend 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand barg das anlagerungsfähige O-Antigen in hoher Konzentration und konnte, ohne eine qualitative Minderung zu erfahren, einige Monate lang im Eisschrank aufbewahrt werden.

Die Verwendung von menschlichen Erythrozyten der Blutgruppe O erhellt aus der Tabelle 2, in der wir eine Gegenüberstellung von Hammel- und Humanerythrozyten in der Prüfung von Humanseren finden. Der Darstellung entnehmen wir das Vorhandensein von Heteroagglutininen gegen Hammelerythrozyten in vier untersuchten Humanseren sowie die Auswirkungen dieser Heteroagglutinine auf Reaktionsausfall und Titer. Das Ergebnis steht repräsentativ für die überwiegende Mehrzahl der untersuchten Seren.

Zitratblut vom Menschen der Blutgruppe O Rh+ wurde gewaschen; Aufschwemmung mit frischer physiologischer Kochsalzlösung und anschließendes Zentrifugieren bei 2000 U/min wiederholten sich dreimal. Einige Tropfen des nach dem letzten Zentrifugieren erhaltenen Erythrozytensediments wurden mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1:1000 verdünnt. Dieser Erythrozytensuspension wurde die Antigenlösung im Verhältnis 1:100 hinzugefügt. Die Adsorption des Antigens an die Erythrozyten vollzog sich in einer halben Stunde bei 37°C ; überschüssiges, noch in Lösung befindliches Antigen wurde durch dreimaliges Auswaschen mit physiologischer Kochsalzlösung entfernt. Diese an jedem Untersuchungstage frisch zubereitete Aufschwemmung von beladenen Blutkörperchen wurde im Verhältnis 1:1 den Serumverdünnungen beigefügt, wobei Wassermannröhrchen zur Verwendung kamen. Nach einer 30 min langen Inkubation bei

37°C wurden die Röhrchen kurz bei 3000 U/ min zentrifugiert und der Reaktionsausfall abgelesen. Dabei konnten 4 positive Haemagglutinationsgrade unterschieden werden: ++++ : ein fest zusammenhängendes, häutchenartiges, durch Schütteln kaum zerstörbares Agglutinat, +++ : mehrere Agglutinatfetzen oder -Bruchstücke in einer klaren Lösung, ++ : viele kleine Körnchen in einer schon leicht getrübten Lösung, + : unter den wiederaufgewirbelten Blutkörperchen finden sich vereinzelte Körnchen. Negativ war der Reaktionsausfall, wenn die nach dem Zentrifugieren zunächst vollständig sedimentierten Blutkörperchen nach leichter Agitation des Gläschens schleierartig in das Lösungsmedium zurückkehrten und dieses, wie vor der Reaktion, trübten. Die erforderlichen Kontrollen, welche später genannt werden sollen, waren jedem Hauptversuch beigesellt.

Der genannten Technik liegt die Arbeit von KIENINGER (1964) zugrunde, dem wir die Erprobung optimaler Reaktionsverhältnisse verdanken. Darüberhinaus finden wir eine ähnliche Technik bei NETER et al. (1956) und NETER et al. (1954).

Für die indirekte Haemagglutination (Vi-Haemagglutination) wurden sorgfältig ausgesuchte V-Form-Kolonien des Stammes Ty2 (freundlicherweise überlassen vom Central Public Health Lab., Colindale, London) auf 1%-igem Nähragar in 5 Drigalski-Schalen ausgespatelt und 24 Std bei 37°C bebrütet. Keimmaterial aus dem gewachsenen Bakterienrasen wurde auf dem Objektträger mit O-9-Serum auf O-Inagglutinabilität geprüft, anschließend konnte jede Schale mit je 6 ml physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt werden, wodurch etwa 25 ml einer dichten Bakteriensuspension gewonnen wurden. 1 Std bei Zimmertemperatur gehalten gaben die suspendierten Bakterien das lösliche Vi-Antigen an das Lösungsmittel ab, welches als Überstand nach einstündigem Zentrifugieren bei 3000 U/min abgehoben werden konnte. Die Abtötung der noch in der Antigenlösung verbliebenen Keime war durch Erwärmung auf 60°C während 1 Std erfolgt, was die anschließende

Sterilitätskontrolle zeigte. Der auf diese Weise denkbar einfach gewonnene Vi-Antigenauszug zeigte sich in serologischer Hinsicht dem phenolextrahierten Antigen (s.unten) ebenbürtig. In der Anlagerung des 1:100 verdünnten Antigens an Humanerythrozyten, in der Technik der Haemagglutination und im Ablesemodus verfuhren wir ebenso, wie bei der vorausgehend geschilderten O-Haemagglutination.

Zwei weitere Verfahren zur Gewinnung von gelöstem Vi-Antigen waren dem dritten, endgültigen vorausgegangen. Eine 60 min lang autoklavierte Aufschwemmung von Bakterien des Stammes 6 S lieferte nach Zentrifugieren einen Vi-Antigen haltigen Überstand, welcher sich als brauchbar für die indirekte Haemagglutination erwies. Als sogenannter reiner Vi-Stamm entbehrt der Stamm 6 S eines mit den bisherigen serologischen Methoden erkennbaren weiteren somatischen Antigens. Obwohl nach der genannten eingreifenden thermischen Behandlung eine Heraussprengung von möglicherweise in der Tiefe der Bakterienzelle vorhandenem O-Antigen und seine in der indirekten Haemagglutination offenbar werdende Anlagerung nicht festgestellt werden konnte, zogen wir jedoch, aus vielleicht unbegründeter Vorsicht, eine schonendere Behandlung vor. Das gleiche gilt auch für das zweite Verfahren der Antigenextraktion, welches zudem für die Reindarstellung von Typhus-O-Polysacchariden entwickelt worden ist. Weil aber exakte serologische Prüfungen den auf die nachfolgend genannte Weise erhaltenen Extrakt als reines Vi-Antigen auswiesen, soll sein kompliziertes Darstellungsverfahren nicht unerwähnt bleiben.

Unter der Verwendung des Stammes 6 S verfuhren wir getreu den Anweisungen von KAUFFMANN, LÜDERITZ et al. (1960) und WESTPHAL, LÜDERITZ und BISTER (1952). Bewachsene Agarplatten werden mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt, die Aufschwemmung 1 Std lang gekocht. Nach Abkühlen werden 300 ml Bakteriensuspension mit 96%-igem Alkohol auf 1 l aufgefüllt. Hinzu kommen 35 ml einer gesättigten, alkoholisch-wäßrigen (86:14) Natriumacetatlösung. Die übernacht bei Zimmertemperatur gehaltene Mischung wird 20 min bei 2000 U/min zentrifugiert und das Zentrifugat mit reinem Alkohol ausgewaschen. Darauf folgt ein letztes Auswaschen mit Azeton, wonach der durch Zentrifugieren erhaltene azetonfeuchte Bodensatz in großen Schalen bei 37°C einen Tag lang getrocknet wird. Etwa 10 g der in dieser Weise aufbereiteten Bakterienmasse werden im Porzellanmörser fein gemahlen und in 160 ml destilliertem Wasser aufgeschwemmt. Nach Vorkühlung der Suspension auf +2°C werden 265 ml einer ebenfalls vorgekühlten 75%-igen Phenol-Wasser-Mischung (200 g Phenol und 65 ml Wasser) hinzugefügt. Die Emulsion wird kräftig geschüttelt und unter gelegentlichem Aufschütteln 10-30 min lang bei +3 bis +5°C stehengelassen. Danach wird der Ansatz bei 3000 bis 4000 U/min möglichst in der Kälte zentrifugiert und die oben befindliche wässrige Lösung abgehoben. Das Zentrifugat wird erneut mit 50 ml Wasser durchgeschüttelt und wieder zentrifugiert. Die hierbei erhaltene wässrige Schicht wird mit der ersten vereinigt, zwei bis drei Tage gegen fließendes Wasser und einen Tag gegen

destilliertes Wasser dialysiert. Das solcherart hergestellte lösliche Vi-Antigen wurde in zahlreichen Vorversuchen verwendet und behielt über mindestens 2 Jahre hindurch eine gleichbleibende Qualität.

Tabelle 3. Vergleichende Prüfung von drei Vi-Antigenextrakten und einem O-Antigenextrakt

Antigen: Ty2-Vi-Extrakt, 22°C/60 min

Seren 1:	25	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	Unbel.E.
Ty-Vi	◕	◕	◕	◕	◕	◕	◕	◕	◕	◖	◖	○
B-Vi	◕	◕	◕	◕	◕	◕	◕	◕	◕	◖	◖	○
O-9,12	○	○	○	○								○
NaCl	○											

Antigen: 6 S-Vi-Extrakt, Phenolextrahiert

Ty-Vi	◕	◕	◕	◕	◕	◕	◕	◕	◕	◖	◖	○
B-Vi	◕	◕	◕	●	●	●	◕	◕	◕	◖	○	○
O-9,12	○	○	○	○								○
NaCl	○											

Antigen: 6 S-Vi-Extrakt, 120°C/60 min

Ty-Vi	◕	◕	●	●	◕	◕	◕	◕	◖	○	○	○
O-4,5,12	○	○	○	○								○
NaCl	○											

Antigen: O-901 -O-Extrakt, 120°C/60 min

Ty-Vi	◕	◕	◕	◕	◖	◖	◖	○	○			○
B-Vi	○	○	○	○								○
O-9,12	◕	◕	◕	◕	◕	◕	◕	◕	◖	◖	◖	○
NaCl	○											

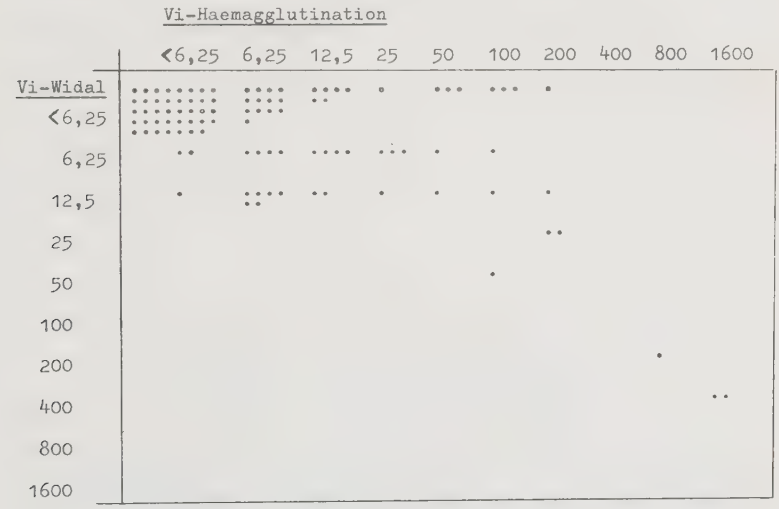
Die Seren: (Kaninchenimmunseren aus dem Robert-Koch-Institut und dem Hygiene-Institut Tübingen)
Ty-Vi, R.K.I.,1741,Aggl.-Titer 1:800, B-Vi, R.K.I.,1535,Ball.-Vi,Titer 1:800
O-9,12, H.I.Tüb. S.enteritidis, O-4,5,12, H.I.Tüb., T19a, S.paratyphi B.
Unbel.E. = Unbeladene Erythrozyten, NaCl = Kochsalzkontrolle

Die Tabelle 3 zeigt die vergleichende Prüfung dreier verschiedener Vi-Antigenextrakte wie auch eines O-Antigenextraktes mit homologen und heterologen Kaninchenimmunseren. Wir ersehen aus dieser Tabelle die serologische Gleichwertigkeit der drei Vi-Extrakte. Aus Gründen, die wir auf S.20 dargelegt hatten, wählten wir das sichere und einfache Verfahren der Vi-Antigenextraktion bei Zimmertemperatur. Wenn wir eine positive Reaktion zwischen O-901-beladenen Erythrozyten und Typhus-Vi-Serum verzeichnen, so liegt dies offenbar an einem gewissen Gehalt des Vi-Serums an O-Agglutininen, der bei der sehr empfindlichen Methode der indirekten Haemagglutination nachgewiesen wird. Der negative Reaktionsausfall der mit O-901-beladenen Erythrozyten gegenüber Ballerup-Vi-Serum zeigt, daß das O-Antigen frei von Vi-Antigenspuren ist.

III. E r g e b n i s s e

150 Humanseren sind mit der vorangehend geschilderten Methodik untersucht worden. Die erhaltenen Agglutinations- und Haemagglutinationstiter sind in Diagrammen aufgeführt, die eine Korrelation der Ergebnisse erlauben. Die folgenden Abbildungen zeigen zunächst die Gegenüberstellung der Untersuchungsmethoden Bakterienagglutination (Widal) und Haemagglutination an den beiden Serumgruppen I (O- und/oder H-Agglutinine enthaltende Seren) und II (keine O- und H-Agglutinine enthaltende Seren), später die Gegenüberstellung der beiden Serumgruppen selbst. Die Serumverdünnungen sind in ihren reziproken Werten angegeben.

Abbildung 1. Verteilung der Vi-Titer der Serumgruppe I

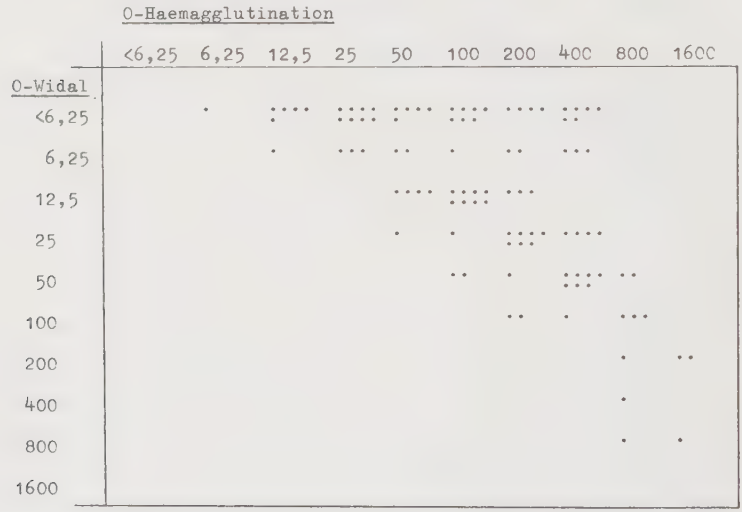


.= Titer eines jeweiligen Serums aus den angegebenen Untersuchungsverfahren

In der Abb.1 zeigen von 100 Seren der Gruppe I 61 eine positive Vi-Reaktion, davon 27 ausschließlich in der Vi-Haemagglutination, 3 ausschließlich in der Vi-Bakterienagglutination und 31 in beiden Verfahren, Vi-Haemagglutination und Vi-Bakterienagglutinati n. Die zuletzt genannten 31 Seren lassen sich unterteilen in 19 Seren mit einem höheren Titer in der Haemagglutination, in 6 Seren mit einem höheren Titer in der Bakterienagglutination und in 6 Seren mit gleicher Titerhöhe in beiden Verfahren.

Ein anderes Bild zeigt die Untersuchung derselben 100 Seren auf ihren Gehalt an O-Bakterienagglutininen und -Haemagglutininen. (Abbildung 2)

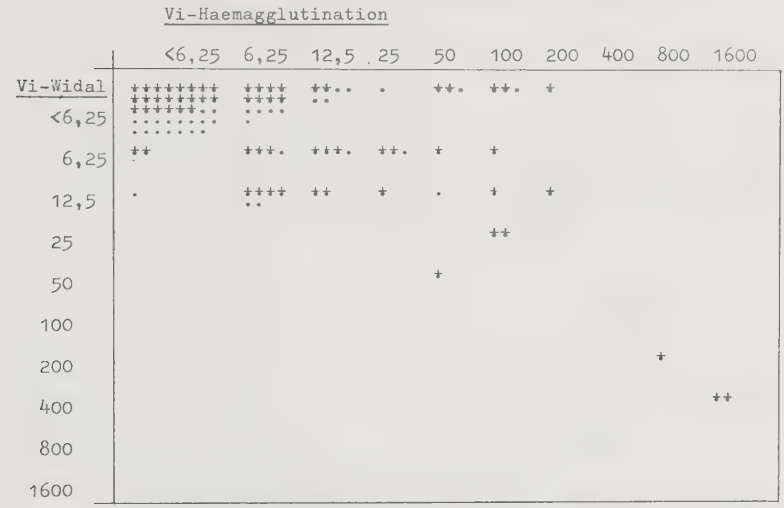
Abbildung 2. Verteilung der O-Titer der Serumgruppe I



•= Titer eines jeweiligen Serums aus den angegebenen Untersuchungsverfahren

Hier finden wir bei allen Seren einen positiven Reaktionsausfall. Ausschließlich in der Haemagglutination bei 36, in Haemagglutination und Bakterienagglutination gemeinsam bei 64 Seren. 99 mal erbrachte die Haemagglutination einen höheren Titer, nur in einem Falle waren Haemagglutinationstiter und Widaltiter von gleicher Höhe. Anders als in Abb.1 erweist sich hier die indirekte Haemagglutination als eine um etwa 3 Titerstufen empfindlichere Reaktion.

Abbildung 3. Vorkommen von O-Bakterienagglutininen in den auf Vi-Antikörper untersuchten Seren der Gruppe I



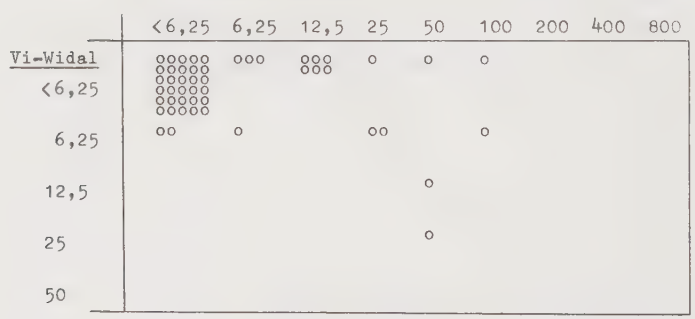
.= Titer eines jeweiligen Serums aus den angegebenen Untersuchungsverfahren
+= Seren mit zusätzlich nachgewiesener positiver O-Bakterienagglutinationsreaktion

Wir erkennen in den Punktsymbolen eine Wiederholung der Abb.1, die dazugesellten Kreuze bedeuten einen gleichzeitig bestehenden O-Bakterienagglutinationstiter in allerdings hieraus nicht hervorgehender Höhe. Die unter den 100 Seren der Gruppe I gefundenen 64 Seren mit einer positiven O-Bakterienagglu-

tination verteilen sich auf die Ergebnisse aus der Untersuchung auf Vi-Antikörper in der folgenden Weise: Unter 39 Vi-negativen Seren finden sich 22 O-positive, unter 61 Vi-positiven Seren finden sich 42 O-positive. Greift man diejenigen Seren heraus, die in beiden Vi-Testen eine positive Reaktion gezeigt haben, so wird eine engere Vergesellschaftung von O- und Vi-Antikörpern deutlich: von 31 in beiden Vi-Testen positiven Seren zeigen 25 eine positive O-Bakterienagglutination.

Die Abbildungen 4 und 5 enthalten die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Seren der Gruppe II.

Abbildung 4. Verteilung der Vi-Titer der Serumgruppe II

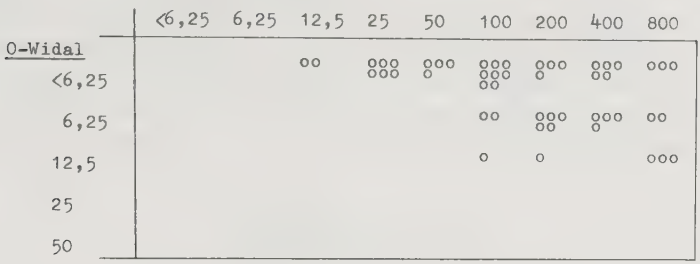


o= Titer eines jeweiligen Serums aus den angegebenen Untersuchungsverfahren

Die Abb. 4 zeigt, daß sich bei 30 von 50 untersuchten Seren innerhalb unserer Verdünnungsgrenzen keine Vi-Antikörper finden. Von 20 positiven Reaktionen entfallen 12 ausschließlich auf die indirekte Haemagglutination, 3 ausschließlich auf die Bakterienagglutination und 6 auf beide Untersuchungsmethoden.

Die Untersuchung derselben 50 Seren (Gruppe II) auf O-Antikörper bringt ein völlig anderes Ergebnis. (Abb. 5)

Abbildung 5. Verteilung der O-Titer der Serumgruppe II



o= Titer eines jeweiligen Serums aus den angegebenen Untersuchungsverfahren

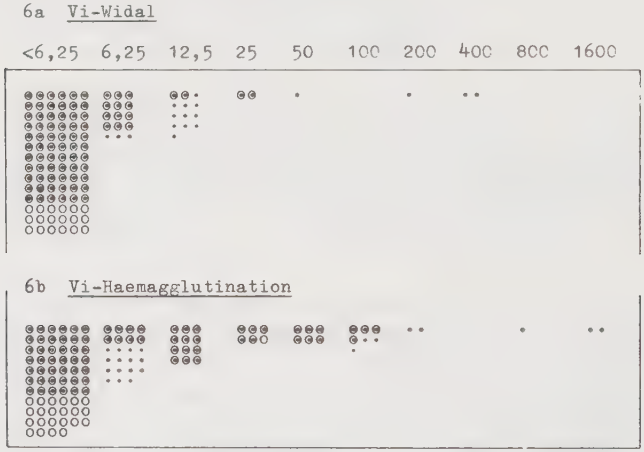
Alle Seren zeigen eine positive Reaktion, entweder nur in der indirekten Haemagglutination (32), oder in Haemagglutination und Bakterienagglutination gemeinsam (18). Kein Serum zeigt einen höheren Bakterienagglutinationstiter als 1:12,5, keines einen Haemagglutinationstiter unter 1:12,5 .

Um einen graphisch darstellbaren Vergleich der Untersuchungsergebnisse von einerseits 100 Seren der Gruppe I und andererseits 50 Seren der Gruppe II herbeizuführen, haben wir die Prozentwerte aus beiden Gruppen übereinanderprojeziert und so den Vergleich der Diagramme erleichtert. In den folgenden Abbildungen 6a und 6b, sowie 7a und 7b finden sich die Serumtiter aus den jeweiligen Untersuchungsmethoden unter ihren Verdünnungsstufen angeordnet, nicht aufgefächert zum Zwecke der Gegenüberstellung der beiden Untersuchungsmethoden, wie in den vorangegangenen Abbildungen.

In nahezu asymptotisch verlaufender Kurve stellt sich die Verteilung der einzelnen Titer aus der Untersuchung auf Vi-Antikörper dar (Abb. 6a und 6b): sehr viele negative Reaktionen werden in allmählich schwächer werdender Anzahl von den stärker positiven Reaktionen gefolgt. Es wird erkennbar, deutlicher im Bereich der Bakterienagglutination (Abb. 6a) als im Bereich der

Haemagglutination (Abb. 6b), daß sich die Titer der Seren der Gruppe II unter den negativen oder schwach positiven Verdünnungsstufen ansiedeln. Der Anteil der Seren ohne nachweisbare Vi-Antikörper ist größer unter den Seren der Gruppe II als unter den Seren der Gruppe I (60 : 39). Umgekehrt ist der Anteil der Vi-positiven Seren unter den Seren der Gruppe I größer. Es läßt sich somit ein unterschiedliches Verhalten der beiden Serumgruppen feststellen.

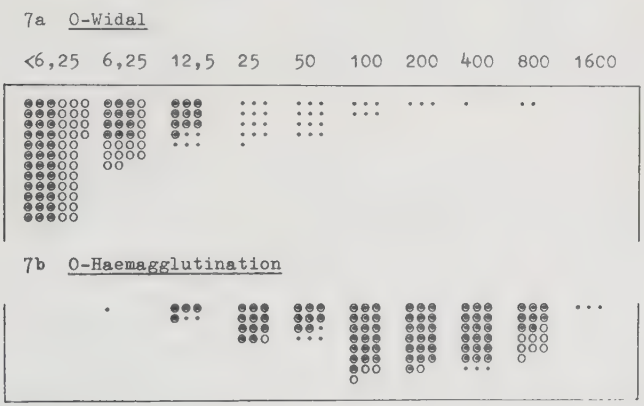
Abbildung 6. Prozentuale Verteilung der Vi-Titer der Seren aus den Gruppen I und II



•= Titer aus der Gruppe I
o= Titer aus der Gruppe II

Deutlich erkennbar ist der Unterschied zwischen beiden Serumgruppen in ihrem O-Agglutiningehalt (Abb. 7a), was hingegen für ihren O-Haemagglutiningehalt (Abb. 7b) kaum zutrifft. Die Feststellung, daß wir weder unter den Seren der Gruppe I, noch unter den Seren der Gruppe II eine negative O-Haemagglutinationsreaktion finden, wird dahingehend ergänzt, daß die Bilder beider Gruppen fast deckungsgleich sind, daß die Verteilung der O-Haemagglutinationstiter beider Gruppen fast identisch ist.

Abbildung 7. Prozentuale Verteilung der O-Titer der Seren aus den Gruppen I und II



.= Titer aus der Gruppe I
o= Titer aus der Gruppe II

Im folgenden wollen wir die dargestellten Ergebnisse besprechen und versuchen, die beobachteten Erscheinungsbilder zu erklären.

IV. Besprechung der Ergebnisse

Die uns am Ende der Einleitung begegnete unterschiedliche Bewertung des Nachweises von Vi-Agglutininen in der serologischen Typhusdiagnose, im besonderen mit Hilfe der indirekten Haemagglutination, gab Veranlassung, eine Reihe von Humanseren - eine Gruppe mit nachgewiesenen O- und/oder H-Agglutininen, sowie eine Gruppe ohne nachweisbare O- und H-Agglutinine - einer vergleichenden Untersuchung auf Vi- und O-Agglutinine mit Hilfe der Bakterienagglutination und der indirekten Haemagglutination zu unterziehen. Dies geschah weniger im Hinblick auf das Dauerausscheiderproblem als im Interesse an einer erneuten Klärung des Wertes der indirekten Haemagglutination für die serologische Typhusdiagnose.

Die in der Einleitung hervorgehobenen methodischen Vorteile der Vi-Haemagglutination gegenüber der Vi-Bakterienagglutination erscheinen im Hinblick auf eine Komplettierung der Typhus-Serodiagnostik begrüßenswert. Ihre Einschränkung, wenn nicht gar Aufhebung erfahren diese Vorteile, wenn mit Hilfe der neuen serologischen Methode aufgrund ihrer erhöhten Empfindlichkeit und einer qualitativ erweiterten Reaktionsfähigkeit unspezifische Antikörper erfaßt werden und damit die Rate der positiven Reaktionen unter Normalseren zu groß wird. Die jahrzehntelang mit unzweifelbarem Erfolg durchgeführte Methode der Bakterienagglutination stellt in unseren Untersuchungen den Bezugspunkt dar, an dem wir die Methode der indirekten Haemagglutination messen.

Die folgende Erörterung behandelt zwei Themenkreise. Zunächst die Gegenüberstellung von O-Bakterienagglutination und O-Haemagglutination, später die Gegenüberstellung von Vi-Bakterienagglutination und Vi-Haemagglutination.

Von den 100 O- und/oder H-Agglutinine enthaltenden Seren,

die uns vom Typhuslaboratorium zur Verfügung gestellt wurden, erwiesen sich in unserer Nachuntersuchung 64 Seren als O-Agglutininhaltig.
Von den 50 keine O- und H-Agglutinine enthaltenden Seren zeigten 18 einen positiven O-Agglutinationstiter, sämtlich unter 1:25. Damit blieben diese Reaktionen unter der im Typhuslaboratorium üblichen Anfangsverdünnung von 1:50.

Diesem Ergebnis, welches sich in der Abbildung 7a durch ein deutliches Auseinanderrücken der beiden Serumgruppen I und II ausdrückt, steht die nahezu vollständige Kongruenz beider Gruppen hinsichtlich ihrer Titer aus der O-Haemagglutination gegenüber.(Abb. 7b). Unter diesen Umständen erscheinen die O-Haemagglutinationstiter aus der, für sich allein betrachteten, Untersuchung der Seren der Gruppe I (Abb.2) in einem neuen Licht. Die Haemagglutinationstiter, die dort in fast regelhaftem Abstand von etwa drei Verdünnungsstufen den Bakterienagglutinationstitern gefolgt sind und damit in nahezu idealer Weise das gemeinsame Vorkommen von O-Agglutininen und O-Haemagglutininen demonstriert haben, diese Haemagglutinationstiter liegen überraschenderweise in der gleichen Verteilung vor, wie die Haemagglutinationstiter aus der Untersuchung der Seren der Gruppe II. Vorausgesetzt, daß die verhältnismäßig geringe Anzahl von Einzelergebnissen statistische Schlußfolgerungen gestattet, erscheint es angesichts des Umstandes, daß unter den Seren beider Gruppen in Anzahl, Höhe und Verteilung ihrer Haemagglutinationstiter ein nahezu übereinstimmendes Ergebnis gefunden worden ist, zum mindesten fraglich, ob mit der indirekten Haemagglutination ausschließlich Typhus-O-Antikörper nachgewiesen worden sind. Allein die Unmöglichkeit einer Differenzierung unter beiden Serumgruppen zwingt uns zu dem Eingeständnis, daß die O-Haemagglutination als diagnostisches Instrument ungeeignet ist.

Die beobachtete weitgehende Übereinstimmung der Ergebnisse der O-Haemagglutination aus der Untersuchung zweier bezüg-

lich der O-Bakterienagglutinine unterschiedlicher Serumgruppen wirft die Frage auf, ob zwischen den beiden Untersuchungsmethoden nicht allein quantitative, sondern vielmehr auch qualitative Unterschiede bestehen. In der höheren Empfindlichkeit der indirekten Haemagglutination gegenüber der Bakterienagglutination erblicken wir einen quantitativen Unterschied, welcher allein schon zur Folge hat, daß die serologische Differentialdiagnose zwischen Immunantikörpern und natürlichen Antikörpern zu einem Problem wird.

Die Annahme, daß mit Hilfe der indirekten Haemagglutination überhaupt O-9-Antikörper, spezifisch für die Salmonellagruppe D, nachgewiesen werden, gründet sich auf zwei Beobachtungen. Ein Agglutinationstiter eines Human- wie auch Kaninchenimmunserums ist regelmäßig von einem meistens höheren, niemals aber niedrigeren Haemagglutinationstiter begleitet. Zwischen den Seren mit S.typhi immunisierter Kaninchen und solchen nicht immunisierter Kaninchen besteht erfahrungsgemäß bezüglich ihrer O-Haemagglutinationstiter ein erheblicher Unterschied.

Neben den, unter den S.typhi-Antikörpern im Vordergrund stehenden O-9-Antikörpern gelangen in der indirekten Haemagglutination, wie übrigens auch in der Bakterienagglutination, Antikörper zum Nachweis, die ihre Entstehung den sogenannten übergreifendenAntigenen (z.B. O-1 und O-12) verdanken. Diese Antikörper rechnen wir zu den Immunantikörpern schwächerer Ausprägung, welche nun aber durch die indirekte Haemagglutination in erhöhtem Maße nachgewiesen eine serologische Abgrenzung spezifischer S.typhi-Antikörper (O-9) von Antikörpern anderer Salmonellengruppen schwieriger gestaltet.

Hohe Empfindlichkeit in der Reaktion der beladenen Erythrozyten gegenüber Immunantikörpern, selbst geringerer Ausprägung, läßt auch die natürlichen Antikörper in erhöhtem Maße zum Nachweis gelangen. Die Frage, in welchem Ausmaße natürliche Antikörper (nachgewiesen mit der indirekten Haemagglutination) gegenüber den verschiedensten Keimen in den Seren

Erwachsener anzutreffen sind und in welcher Weise diese im Laufe des Lebens an Gewicht zunehmen, ist Gegenstand der im folgenden erwähnten Arbeiten.

Untersuchungen über das Vorkommen von O-Haemagglutininen gegen verschiedene Coli-Antigene (O 55, O 111, O 26) in den Seren von Kindern unterschiedlichen Alters finden wir bei NETER et al.(1955) sowie bei NETER und DUNPHY (1957). Während die Seren von Säuglingen bis in das Alter von 6 Monaten nur in etwa 10% der Fälle O-Haemagglutinationstiter von 1:10 bis 1:40 aufweisen, finden sich bei älteren Kindern (bis 12 Jhr.) in über 90% der Fälle O-Haemagglutinationstiter bis 1:60. Im Nabelvenenblut von Neugeborenen lassen sich keine, oder nur ganz vereinzelt (nur bis zu einem Titer von 1:10), Antikörper nachweisen, wohingegen die Seren der Mütter dieser Kinder ausnahmslos die oben genannten Antikörper enthalten. Nur bei 3 von 323 untersuchten Kinderseren ist mit der Bakterienagglutination ein Titer bis 1:10 festgestellt worden.

Die mit zunehmendem Alter wachsende Menge und Verbreitung von derartigen Antikörpern zeigt eine Untersuchung über das Vorkommen von Haemagglutininen gegen O-Antigene verschiedener enteropathogener Keime in handelsüblichem menschlichem Gamma-Globulin von NETER, DRISLANE, et. al.(1959). In Proben von Gamma-Globulin aus verschiedenen Ländern der Welt, mehr noch in einem Kontrollmischserum von 20 gesunden Erwachsenen sind Haemagglutinine gegen polyvalentes Salmonellenantigen nachgewiesen worden, in ersteren bis zu einem Titer von 1:80, in letzterem bis zu einem Titer von 1:160. Durch Absorption, entweder mit ganzen Bakterienzellen oder mit Antigen beladenen Erythrozyten war es den Autoren möglich, homologe, natürliche Antikörper bis zu einem gewissen Grade zu eliminieren.

Die Frage nach der Herkunft dieser weit verbreiteten natürlichen Antikörper, selbst von solchen gegen die Shiga-Ruhr, welche in den Vereinigten Staaten außergewöhnlich selten beobachtet wird, harrt noch ihrer Erklärung, ebenso die Beobachtung, daß zwischen Haemagglutinationstiter und Bakterienagglutinationstiter keine strenge Abhängigkeit besteht.

Für die Serodiagnose von gastro-enteralen Infektionen mit den verschiedensten Enterobacteriaceae fordern die Autoren folgendes: Nur dann sei ein Haemagglutinationstiter gegen den krankmachenden Erreger beweisend, wenn dieser in Anstieg und Abfall während der Krankheit von ähnlichen Bewegungen der Haemagglutinationstiter gegen heterologe Antigene nicht begleitet wird.

Tabelle 4. O- und Vi-Haemagglutinine in Säuglingsseren

	Antigen: Ty-O-901 Extrakt 120°C,60'					Ty-Vi-6S phenolextr.					Unbel. Ery
Seren 1:	20	40	80	160	320	20	40	80	160	320	
1	○	○	○	○		○	○	○	○		○
2	○	○	○	○		○	○	○	○		○
3	○	○	○	○		○	○	○	○		○
4	○	○	○	○		○	○	○	○		○
5	○	○	○	○		○	○	○	○		○
6	○	○	○	○		○	○	○	○		○
7	○	○	○	○		○	○	○	○		○
8	○	○	○	○		○	○	○	○		○
9	○	○	○	○		○	○	○	○		○
10	○	○	○	○		○	○	○	○		○
924^{+}	●	◕	◕	◖	◖	◔	○	○	○		○
$T29b^{++}$	●	◕	◕	◕	◕	○	○	○	○		○
1535^{+++}	○	○	○	○		◕	◕	◕	◕	◖	○
NaCl	○					○					○

924^{+} = Humanserum, Aggl.-Titer 1:200
$T29b^{++}$ = Kaninchenimmunserum aus Hyg.Inst.Tüb., immunisiert mit Ty-O-Stamm O-901, Aggl.-Titer 1:1600
1535^{+++} = Ballerup-Vi-Serum aus Rob.K.Inst.,Aggl.-Titer 1:800

Wir bedanken uns bei Herrn Doz.Dr.Marget aus der Tübinger Universitäts-Kinderklinik für die freundliche Überlassung der Seren.

Aus der Tabelle 4 geht hervor, daß keines der 10 Säuglingsseren einen - in den angegebenen Verdünnungsbereichen - positiven Haemagglutinationstiter besitzt. Hierzu siehe auch WALTER (1968).

Was das ubiquitäre Vorkommen von Typhus-O-Haemagglutininen in den von uns untersuchten Seren der Gruppe II betrifft, so können wir dies zum Teil auf das Vorliegen von natürlichen Antikörpern zurückführen, natürlichen Antikörpern gegen die O-Antigene 1 und/oder 9 und/oder 12, für deren Anwesenheit eine Erkrankung oder aktive Immunisierung mit S.typhi nicht erforderlich sein muß. Wenn auch festgestellt werden muß, daß ein Großteil der natürlichen Antikörper durch die höhere Empfindlichkeit der indirekten Haemagglutination in unseren differentialdiagnostischen Überlegungen Berücksichtigung finden muß, so ist dennoch zu erwarten, daß zwei Serumkollektive, die sich mit den bisherigen serologischen Untersuchungsmethoden klar differenzieren lassen, sich auch unter Anwendung einer nur empfindlicheren Untersuchungsmethode gleichfalls differenzieren lassen.

Somit bleibt weiterhin ungeklärt die auffallende Gleichheit in der Verteilung der O-Haemagglutinationstiter bei den Seren der Gruppen I und II. Hier ergibt sich ein Gegensatz zu NETER und seinen Mitarbeitern, denen eine Unterscheidung ähnlicher Gruppen durch eine signifikante Titerdifferenz immer gelungen ist. Möglicherweise bietet die voneinander abweichende Art der Antigenpraeparation einen Anhalt für eine Erklärung. Während das O-Antigen NETER's durch einstündiges Kochen der Bakterienaufschwemmungen gewonnen wird, verwenden wir einen durch einstündiges Autoklavieren erhaltenen Antigenauszug. Wir haben uns für die weitergehende thermische Behandlung entschieden, weil sich in mehreren Versuchen damit in Kaninchenimmunseren ein höherer Haemagglutinationstiter hat erzielen lassen. Es erscheint nicht unmöglich, daß durch die weitergehende thermische Behandlung antigene Substanzen freigesetzt werden, die an Erythrozyten angelagert ein grundsätzlich von der bisher bekannten Typhusserologie verschiedenes

Antigen darstellen. Damit ließe sich der qualitative Unterschied der O-Haemagglutination zur O-Bakterienagglutination, wenn auch nur andeutungsweise, erklären.

Welcher Natur die in jedem von uns untersuchten Humanserum festgestellten Haemagglutinine auch seien, die berichteten Ergebnisse sprechen gegen die Anwendung der indirekten Haemagglutination in der Diagnose von S.typhi-O-Antikörpern beim Menschen. Aus diesem Grunde haben wir in der Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den Untersuchungen auf O- und Vi-Antikörper von einer Berücksichtigung der O-Haemagglutinationstiter abgesehen und nur die O-Bakterienagglutinationsreaktionen in der Darstellung (Abb.3) aufgeführt.

Über das gemeinsame Vorkommen von O- und Vi-Antikörpern unter den Seren der Gruppe I unterrichtet die Abbildung 3.
Einen O-Titer finden wir einmal bei 42 der 61 Vi-positiven Seren, zum anderen bei 22 der 39 Vi-negativen Seren. Etwas häufiger also liegen positive O- und Vi-Reaktionen gemeinsam, etwas seltener getrennt vor. 22 in der O-Bakterienagglutination positive Seren entbehren eines gleichzeitigen Vi-Titers, wie 19 Vi-Antikörper enthaltende Seren eines O-Bakterienagglutinationstiters entbehren. Die Ausbildung beider Typhusantikörper geht nicht gleichsinnig vonstatten; die Bewegung der Titer beider Antikörper im Verlaufe einer Erkrankung (KNAPP, 1948 u. 1948b), einer Impfung oder bei Dauerausscheidern verläuft nicht parallel.

So finden wir auch in der Serumgruppe II, der Gruppe ohne nennenswerte O-Bakterienagglutinine, positive Vi-Agglutinationstiter: 16% mit einem Titer höher als 1:6,25, 4% mit einem Titer höher als 1:12,5.(Im Vergleich dazu die Gruppe I mit 34, bzw. 17 positiven Vi-Agglutinationstitern).

Wenn überhaupt eine klare differentialdiagnostische Trennung zwischen unseren untersuchten oder ähnlichen Serumgruppen mit Hilfe von Labormethoden herbeigeführt werden soll, dann ergeht an ein neues serologische Instrument die Forderung einer zum mindesten ebenso klaren oder besser klareren Unter-

scheidungsmöglichkeit zwischen diesen Gruppen, als dies mit Hilfe der bisherigen Methode möglich ist.

Die vom O-Antigen verschiedene Lokalisation des Vi-Antigens in der Bakterienkapsel, seine leichte Wasserlöslichkeit und demzufolge der andersartige, schonendere Ablösemodus in der Regel schon bei Zimmertemperatur geben Gewähr dafür, daß wir es mit dem an Erythrozyten adsorbierten Material allein mit Vi-Antigen zu tun haben. Ob dadurch die Vi-Haemagglutination die Forderungen an ein geeignetes serologisches Instrument erfüllen kann, soll an Hand unserer Ergebnisse diskutiert werden.

In der Abb.1 zeigen unter den insgesamt 61 Vi-positiv reagierenden Seren 46 Seren einen höheren Titer in der Haemagglutination, 6 Seren einen gleichhohen Titer in Haemagglutination und Bakterienagglutination, 6 Seren einen höheren Titer in der Bakterienagglutination; 3 Seren reagieren ausschließlich in der Bakterienagglutination. Dies gibt Anlaß zu der Vermutung, daß zwischen beiden serologischen Methoden nicht nur ein quantitativer, sondern auch ein qualitativer Unterschied besteht. In drei Seren sind mit der Vi-Bakterienagglutination Antikörper nachgewiesen worden, die mit der Vi-Haemagglutination nicht erfaßt worden sind.

Die Möglichkeit, daß durch die in der Bakterienagglutination verwendete Vi-Ballerupsuspension somatisches Ballerup-Antigen (O-29) mit Ballerup-Immunantikörpern reagiert hat, erscheint angesichts der so gut wie nie beobachteten Ballerup-Infektionen im Einzugsbereich des Tübinger Hygiene-Instituts zum mindesten fraglich. Das Fehlen von Vi-Haemagglutininen bei gleichzeitiger Anwesenheit von Vi-Bakterienagglutininen ist entweder Ausdruck einer Verschiedenheit von Ballerup- und Typhus-Vi-Antigen - was in mehreren Untersuchungen von KAUFFMANN, FELIX, LANDY und anderen immer wieder verneint worden ist - oder Ausdruck einer durch die unterschiedliche physikalische Behandlung beider, zuvor identischer Vi-Antigene bedingten Trennung des in der Bakterienagglutination und des

in der indirekten Haemagglutination zur Reaktion gelangenden Vi-Antigens.

Einerseits haben wir es bei der Bakterienagglutination mit Vi-Antigen zu tun, das als Funktions- oder Gerüstsubstanz in der Kapsel der Bakterienzelle eingelagert ist und somit unverändert mit den Serumagglutininen in Reaktion tritt, andererseits mit herausgelösten Polysaccharidmolekülgruppen, die sich an der Oberfläche von Blutkörperchen mit diesen zusammen zu haemagglutinationsfähigen Einheiten verbinden. Die möglicherweise bestehende Trennung des Vi-Antigens in zwei geringgradig, vermutlich nur sterisch voneinander verschiedene Anteile wäre gering genug, um eine sichere Abgrenzung zu anderen Antigenen zu gewährleisten, groß genug, um in unterschiedlichen serologischen Reaktionen zu Tage zu treten.

Damit versuchen wir eine Erscheinung zu deuten, die auch HAVLIK und POTUZNIK (1961) beobachtet, aber nicht erörtert haben. In ihren Ergebnissen aus vergleichenden serologischen Untersuchungen im Verlaufe einer Typhusepidemie finden wir ähnliche Unterschiede zwischen Bakterienagglutination und indirekter Haemagglutination, obgleich die Verfasser sich in beiden Testen des gleichen Stammes (Ty-ViI) als Vi-Antigenlieferanten bedient haben.

Wir wollen weiter nur anmerken, daß auch NETER und DUNPHY (1957) die Möglichkeit eines qualitativen Unterschiedes der in Bakterienagglutination und Haemagglutination wirksam werdenden Antigene erwähnen.

Titerdifferenzen zwischen Bakterienagglutination und indirekter Haemagglutination haben RABE und PLONKO (1954) bewogen, Unterschiede in ein und demselben Klebsiellenantigen anzunehmen. Diese Annahme hat sich aufgrund von kreuzweisen Absorptionsversuchen als richtig erwiesen.

Die uns verbleibenden Reste der drei genannten Seren haben eine eingehendere Untersuchung dieses Gegenstandes nicht zugelassen, was zudem die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit überschritten hätte.

Kommen wir nun zur Erörterung der Abbildungen 6a und 6b, denen wir, in Prozentsätzen angegeben, die Ergebnisse der Gegenüberstellung von 100 Seren der Gruppe I und 50 Seren der Gruppe II hinsichtlich ihrer Vi-Antikörpertiter entnehmen.

Die Vi-Bakterienagglutination ermöglicht hier, wie in der Untersuchung auf O-Agglutinine, eine deutliche Trennung zwischen beiden Serumgruppen. Die Vi-Haemagglutination erlaubt gleichfalls eine Unterscheidung, wenn diese auch nicht so deutlich ausfällt, wie im Bereich der Bakterienagglutination. Aus diesem Grunde erscheint hier die indirekte Haemagglutination eher als eine serologische Methode, mit deren Hilfe sich Vi-Antikörper nachweisen lassen.

Im einzelnen erheben wir folgendes: Unter den Seren der Gruppe II finden sich 40 positive Reaktionen, welche sich auf drei Reaktionsmöglichkeiten verteilen: 4 ausschließlich in der Bakterienagglutination, 12 in Bakterienagglutination und Haemagglutination gemeinsam und 24 ausschließlich in der Haemagglutination. Wenn wir weiter auch feststellen können, daß 3/4 der Seren, die eine positive Vi-Bakterienagglutination aufweisen, gleichzeitig von einer positiven Haemagglutinationsreaktion begleitet sind - was für die Identität von agglutinierenden und haemagglutinierenden Antikörpern spräche - so finden wir andererseits aber auch eine Bestätigung für unsere Vermutung bezüglich einer Trennung des Vi-Antigens, welche sich darin ausdrückt, daß manche Seren entweder nur Bakterienagglutinine oder nur Haemagglutinine beherbergen.

Diese Vermutung, sollte sie zutreffen, bedeutet für die Typhus-Vi-Diagnose eine besondere Belastung. In Verfolgung der Absicht, sich kein Vi-Antikörper enthaltendes Serum entgehen zu lassen, zwingt sie zu der Anwendung beider Untersuchungsmethoden. Diese Absicht kollidiert jedoch mit der Tatsache, daß auf diese Weise 40 positive Resultate unter den Seren der Gruppe II erzielt werden. Eine Verminderung dieser in der Typhusdiagnostik kaum zu bewältigenden Menge von zu einem größeren Teil wahrscheinlich uninteressanten positiven Ergebnissen läßt sich auch nicht durch die Einführung eines Grenztiters erreichen.

Inwieweit es sich bei den schwach positiven Seren um bedeutungslose Fälle, und umgekehrt, bei den höhertitrigen Seren um in der Typhusdiagnose ernst zu nehmende Fälle handelt, mag einer weiteren Untersuchung vorbehalten bleiben, in der anamnestische Angaben und bakteriologische Untersuchungen diesen Sachverhalt bestätigen müssen.

Die Anwendung eines kombinierten Bakterienagglutinations- und Haemagglutinationstestes wird in besonderem Maße bei der serologischen Keimträgersuche dem Problem der Spezifität und der Treffsicherheit Rechnung tragen müssen. In der Literatur, die wir eingangs erwähnt haben, nimmt dieses Problem einen sehr großen Raum ein, findet zugleich aber auch eine unterschiedliche Beantwortung. Ohne im einzelnen eine Aufzählung der mehr oder minder optimistischen Ergebnisse anführen zu müssen, kann man überblickend feststellen, daß bezüglich der Treffsicherheit einerseits, wie der belastenden Erfassung von sogenannten unspezifischen Reaktionen andererseits weder mit der Vi-Bakterienagglutination, noch mit der Vi-Haemagglutination allein zufriedenstellende Ergebnisse erreicht worden sind. Insbesondere die großen Hoffnungen, die sich auf die Ergebnisse von SCHUBERT, EDWARDS und RAMSEY (1959) hinsichtlich der indirekten Haemagglutination gründeten, wichen in der Nachuntersuchung durch ANDERSON (1960) einer ebensolchen Ernüchterung.

Wenn auch ein Vi-Antikörpertiter, vor allem bei Nachuntersuchungen im Rekonvaleszentenstadium, eine wünschenswerte Bereicherung der diagnostischen Möglichkeiten, nicht zuletzt im Hinblick auf die Dauerausscheiderprognose, bedeutet, so müssen wir an Hand unserer Ergebnisse feststellen, daß allein aus Gründen einer viel zu großen Anzahl von positiven Reaktionen unter den Seren der Gruppe II ein diagnostischer Wert einem gefundenen Vi-Antikörper nicht zukommt. Hier ist es die hohe Empfindlichkeit der indirekten Haemagglutinationsreaktion, wie auch eine noch zu beweisende

Trennung des in Bakterienagglutination und Haemagglutination wirksam werdenden Vi-Antigens, welche den Eingang der Vi-Haemagglutination in die serologische Typhusdiagnostik verstellen.

Daß wir damit noch keineswegs am Ende der diagnostischen Möglichkeiten stehen, deuten Arbeiten an, in denen sich die Verfasser noch empfindlicherer Methoden bei der Suche nach Vi-Antikörpern bedienen. Dazu gehört die Haemolysevariante der indirekten Haemagglutination wie auch der Haemagglutinations-Coombs-Test zur Erfassung von inkompletten Antikörpern. Ob jedoch durch eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit in serologischen Testen der Diagnose ein Dienst erwiesen wird, mag angezweifelt werden.

V. Zusammenfassung

Zwei Verfahren zum Nachweis von Typhus O- und Vi-Antikörpern, die Bakterienagglutination und die indirekte Haemagglutination wurden in einer vergleichenden Untersuchung einander gegenübergestellt.

Untersucht wurden 100 Seren mit S.typhi-O- und/oder -H-Agglutininen sowie 50 Seren ohne S.typhi-O- und -H-Agglutinine.

Für die O-Bakterienagglutination verwendeten wir mit Alkohol abgetötete Keime des unbeweglichen S.typhi-Stammes O-901, für die O-Haemagglutination einen durch einstündiges Autoklavieren des gleichen Stammes gewonnenen O-Antigenauszug, welcher an Humanerythrozyten der Blutgruppe O angelagert wurde.

Für die Vi-Bakterienagglutination verwendeten wir tiefgefrorene, vor Gebrauch aufgetaute Keimaufschwemmungen des in V-Form vorliegenden Ballerup-Stammes, für die Vi-Haemagglutination einen bei Zimmertemperatur aus wäßriger Bakterienaufschwemmung gewonnenen Vi-Antigenauszug. Antigenlieferant war der in V-Form vorliegende S.typhi-Stamm Ty2. Das in den beiden verschiedenen Vi-Stämmen vorkommende Vi-Antigen ist serologisch identisch.

Die O-Haemagglutination erweist sich bei der Differenzierung zweier durch die O-Bakterienagglutination deutlich zu trennenden Serumgruppen der O-Bakterienagglutination als unterlegen. In der Gruppe der 50 Seren ohne O- und H-Agglutinine zeigt sich in Anzahl, Höhe und Verteilung der gefundenen O-Haemagglutinationstiter ein etwa gleiches Ergebnis wie aus der Untersuchung der Gruppe der 100 Seren mit O- und/oder H-Agglutininen.

Den in der Serumgruppe ohne nachgewiesene O- und H-Agglutinine mit Hilfe der Vi-Bakterienagglutination gefundenen 4% Seren mit einem höheren Vi-Titer als 1:12,5 stehen 28% Seren gleicher Reaktionsstärke aus der Vi-Haemagglutination gegenüber. Diese durch die hohe Empfindlichkeit erreichte Vielzahl von positiven Ergebnissen in der Vi-Haemagglutination, wie auch eine vermutete Trennung des in den beiden unterschiedlichen Verfahren zur Reaktion gelangenden Vi-Antigens lassen die Vi-Haemagglutination als Ergänzung oder Ersatz der Vi-Bakterienagglutination als nicht tauglich erscheinen.

VI. L i t e r a t u r

ANDERSON,E.S. Screening test for typhoid carriers. Lancet 1960/I 653 (1960)

ANDO,K., H.SHIMOJO Stable suspension for Vi-agglutination tests. Bull.Wld Hlth Org. 9, 575 (1953)

BADER,R.E. Gruber-Widalsche Reaktion und Typhusschutzimpfung. Münch.med.Wschr. 87, 1257 (1940)

BADER,R.E. Die Latex-Geißel-Agglutination. Z.Hyg.Infekt.-Kr. 150, 199 (1964)

BAKER,E.E.,R.E.WHITESIDE et al. The Vi antigens of the enterobacteriaceae, I.Purification and chemical properties. J.Immunol. 83, 680 (1959)

BAUMGARTEN,K. Die Brauchbarkeit immunologischer Schwangerschaftsreaktionen. Wien.med.Wschr. 114, 660 (1964)

BHATNAGAR,S.S. Vi agglutination in the diagnosis of typhoid fever and the typhoid carrier condition. Brit.med.J. Seite 1195 (1938)

BHATNAGAR,S.S. et al. A Vi variant of Salmonella typhi and its application to the serology of typhoid fever. J.Hyg. (Lond.) 38, 663 (1938)

BIER,O. Observations préliminaires sur l'hémagglutination, l'hémolyse et la conglutination "passives". Ann.Inst. Pasteur 81, 650 (1951)

BOIVIN,A. et al. Technique pour la préparation de polysaccharides microbiens spécifiques. C.R.Soc.Biol.(Paris) 113, 490 (1933)

BOKKENHEUSER,V.,E.A.GORZYNSKI et al. Immune agglutination and lysis of antigen modified erythrocytes from various animal species. Proc.Soc,Exp.Biol.Med.(N.Y.) 110, 94 (1962)

BOKKENHEUSER,V.,P.SMIT et al. A challenge to the validity of the Vi test for the detection of chronic typhoid carriers. Amer.J.publ.Hlth. 54, 1507 (1964)

BOYDEN,S.V.,E.SORKIN A study of antigens active in the tannic acid hemagglutination test present in filtrates of culture of mycobacterium tuberculosis. J.Immunol. 75, 15 (1955)

CASTELLANI,A. Die Agglutination bei gemischter Infection und die Diagnose der letzteren. Z.Hyg.Infekt.-Kr. 40, 1 (1902)

CHU,D.C.-Y.,R.E.HOYT Reactions of T Vi and Ballerup Vi haptenes with antisera against Vi-coated erythrocytes. J.Hyg.(Lond.) 52, 100 (1954)

CORVAZIER,P. Etude de l'antigène Vi à l'aide d'une technique d'hémagglutination passive. Ann.Inst.Pasteur 83, 173 (1952)

ELIOT,C.P. The Vi agglutination test as an aid in the detection of chronic typhoid carriers. Amer.J.Hyg. 31, 8 (1940,Sec.B)

FELIX,A. Standardization of diagnostic agglutination tests. Typhoid and Paratyphoid A and B fevers. Bull. Wld Hlth Org. 2, 643 (1950)

FELIX,A. The properties of different Salmonella Vi antigens. J.Hyg.(Lond.) 50, 515 (1952)

FELIX,A. The serological classification of bacteriaceae. J.Hyg. (Lond.) 50, 558 (1952)

FELIX,A.,R.M.PITT A new antigen of B.typhosus. Its relation to virulence and to active and passive imunisation. Lancet 227, 186 (1934/II)

FELIX,A., K.S.KRIKORIAN, R.REITLER The ocurrence of typhoid bacilli containig Vi antigen in cases of typhoid fever and of Vi antibody in their sera. J.Hyg.(Lond.) 35 421 (1935)

GIONAVARDI,A. Die Antigenstruktur des B.Typhi und ihre Bedeutung für die Herstellung von Typhusimpfstoffen. Z.Hyg. Infekt.-Kr. 120, 273 (1937)

GRABAR,P., P.CORVAZIER Substances antigeniques et haptènes polyosidiques Vi de Salmonella Typhi. Ann.Inst.Pasteur 80, 255 (1951)

HABS,H. Die Gruber-Widalsche Reaktion bei Schutzgeimpften. Z.Hyg.Infekt.-Kr. 122, 503 (1940)

HAVLIK,J., V.POTUZNIK Serologische Untersuchungen im Verlauf einer Bauchtyphusepidemie. Z.Immun.-Forsch. 121, 311 (1961)

HEYNS,K. et al. D-Galaktosaminuronsäure (2-Amino-2-desoxy-D-Galakturonsäure) als Baustein des Vi-Antigens. Chem.Ber. 92, 2435 (1959/II)

KAUFFMANN,F. Über einen neuen serologischen Formenwechsel der Typhusbacillen. Z.Hyg.Infekt.-Kr. 116, 617 (1935)

KAUFFMANN,F. Über das Vorkommen von Salmonellaantigenen in Coli-Kulturen. Acta path.microbiol.scand. 18, 225 (1941)

KAUFFMANN,F., E.MØLLER A new type of Salmonella (S.Ballerup) with Vi-Antigen. J.Hyg.(Lond.) 40, 246 (1940)

KAUFFMANN,F., O.LÜDERITZ et al. Zur Immunchemie der O-Antigene von Enterobacteriaceae. Zbl.Bakt.,I.Abt.Orig. 178, 442 (1960)

KEOGH,E.V.,E.A.NORTH,M.F.WARBURTON Haemagglutinins of the Haemophilus group. Nature (Lond.) 160, 63 (1947)

KEOGH,E.V.,E.A.NORTH,M.F.WARBURTON Adsorption of bacterial polysaccharides to erythrocytes. Nature (Lond.) 161,687 (1948)

KIENINGER,G. Untersuchungen zur Methodik der indirekten Haemagglutination. Med.Inaug.-Diss.,Tübingen (1964)

KNAPP,W. Über das Auftreten von Vi-Antigen und Vi-Antikörpern. Z.Hyg.Infekt.-Kr. 127, 608 (1948)

KNAPP,W. Das Vi-Antigen und seine Antikörper in der Serodiagnostik des Typhus abdominalis. Dtsch.med.Wschr. 73, 404 (1948)

KOPACKA,B. et al. (Serologische und bakteriologische Untersuchungen zur Feststellung von Typhusbazillenträgern.) Méd. Dóswiąd. i mikrobiol 13, 1 (1961), referiert im Zbl.Bakt., I.Abt.Ref. 181, 461 (1961)

LANDY,M. Studies on Vi antigen. I.Relative Vi antigen content of V form cultures. Proc.Soc.Exp.Biol.Med.(N.Y.) 80, 55 (1952)

LANDY,M. On hemagglutination procedures utilizing isolated polysaccharide and protein antigens. Amer.J.publ.Hlth. 44, 1059 (1954)

LANDY,M.,M.E.WEBSTER Studies on Vi antigen.III. Immunological properties of purified Vi antigen derived from Escherichia coli 5396/38. J.Immunol. 69, 143 (1952)

LANDY,M.,E.LAMB Estimation of Vi antibody employing erythrocytes treated with purified Vi antigen. Proc.Soc.Exp.Biol.Med.(N.Y.) 82, 593 (1953)

LANDY,M. et al. Antibody responses of man to three types of antityphoid immunizing agents: heat-phenol fluid vaccine, acetone-dehydrated vaccine and isolated Vi and O antigens. Amer.J.publ.Hlth. 44, 1572 (1954)

LANDY,M. et al. Studies on Vi antigen. V. Comparison of the immunological properties of Vi antigens derived from V form enterobacteriaceae. J.Immunol. 73, 23 (1954)

LANDY,M.,R.CEPPELLINI Production of "O inagglutinability" in erythrocytes coated with typhoid Vi and O antigens. Nature(Lond.) 176, 1266 (1955)

LANDY,M. et al. Studies on Vi antigen. VIII. Role of acetyl in antigenic activity. Amer.J.Hyg. 73, 55 (1961)

LE MINOR,L., S.LE MINOR, J.GRABAR Réaction d'hémagglutination passive et d'hémolyse directe au moyen de globules rouges sensibilisés par des substances solubles O et Vi d'entérobactériacées. Ann.Inst.Pasteur 83, 62 (1952/II)

LONGFELLOW,D., G.F.LUIPPOLD Typhoid vaccine studies. VIII.The immunogenetic relationship between the V forms of E.typhosa and S.ballerup. Amer.J.Hyg. 37, 206 (1943)

MÖBIUS,L. Über die Brauchbarkeit einer stabilen Aufschwemmung für den Vi-Widal. Dtsch.Gesundh.-Wes. 10, 1311 (1955)

NETER,E. Bacterial hemagglutination and hemolysis. Bact.Rev. 20, 166 (1956)

NETER,E., E.A.GORZYNSKI et al. Studies on bacterial hemagglutination. Amer.J.publ.Hlth. 44, 49 (1954)

NETER,E., O.WESTPHAL et al. Demonstration of antibodies against enteropathic E.coli in sera of children of various ages. Pediatrics 16, 801 (1955)

NETER,E., E.A.GORZYNSKI et al. The enterobacterial hemagglutination test and its diagnostic potentialities. Canad.J. Microbiol. 2, 232 (1956)

NETER,E., O.WESTPHAL et al. The bacterial hemagglutination test for the demonstration of antibodies to enterobacteriaceae. Ann.N.Y.Acad.Sci. 66, 141 (1956)

NETER,E., D.DUNPHY The duration of the hemagglutinin response in the serum of children with shigellosis and salmonellosis. Pediatrics 20, 78 (1957)

NETER,E., A.M.DRISLANE et al. Studies on antibodies against enteric pathogens in human gamma globulin. Amer.J.publ. Hlth. 49, 1050 (1959)

PELUFFO,C.A. Stability of Vi antigen of Salmonella typhi. Proc.Soc.Exp.Biol.Med.(N.Y.) 48, 340 (1941)

PIJPER,A., C.G.CROCKER The agglutinins of typhoid carriers. J.Hyg.(Lond.) 37, 332 (1937)

Report of the P.H.L.S. The detection of the typhoid carrier state. J.Hyg.(Lond.) 59, 231 (1961)

RABE,E.F., M.PLONKO The antibody respose to gram negative organisms: an explanation of the differences between bacterial and hemagglutinating antibody titers.

RAMMLER,L. Auffinden von Typhusbazillenträgern mit Hilfe des Vi-Antigens. Zbl.Bakt.,I.Abt.Orig. 150, 33 (1943)

RAUSS,K. Die Rolle des Antigens Vi bei der Variation der Typhusstämme. Z.Immun.-Forsch. 97, 281 (1940)

RISCHE,H. Die Vi-Agglutination zur Ermittlung von Typhusbakterien-Dauerausscheidern. Dtsch.Gesundh.-Wes. 5, 205 (1950)

SCHUBERT,J.H.,P.R.EDWARDS, C.H.RAMSEY Detection of typhoid carriers by agglutination tests. J.Bact. 77, 648 (1959)

SPAUN,J. On the determination of Vi-antibodies by haemagglutination. Acta path.microbiol.scand. 29, 416 (1951)

SPAUN,J. Determination of Salmonella typhi O and Vi antibodies by haemagglutination. Acta path.microbiol.scand. 31, 462 (1952)

STAACK,H.H.,J.SPAUN Serological diagnosis of chronic typhoid carriers by Vi-haemagglutination. Acta path.microbiol. scand. 32, 420 (1953)

STAUB,A.M.,M.RAYNAUD Connaissances actuelles sur la nature chimique des antigènes présents dans les Salmonella. In: The world problem of salmonellosis, ed.by van Oye,E., Junk, The Hague 1964

STUART,C.A., E.R.KENNEDY Thermostability and alcohol solubility of Vi antigen. Proc.Soc.Exp.Biol.Med.(N.Y.) 68, 455 (1949)

TOMASIC,P. et al. Serology in the detection of chronic typhoid carriers. Atti 6.Congr.int.Microbiol.(Roma) 7, 140 (1953)

WAGNER,V., M.ZDENKA Der Einfluß des Zentrifugierens auf die Agglutination der Salmonellen. Zbl.Bakt.,I.Abt.Orig. 189, 372 (1963)

WALTER,B. Bestimmung der Antikörper gegen Escherichia coli, Pasteurella pseudotuberculosis und Salmonella typhi im Serum gesunder Kinder verschiedener Altersstufen mit der Methode der indirekten Haemagglutination. Med.Inaug.-Diss.,Tübingen (1968)

WEBSTER,M.E., M.LANDY, M.E.FREEMAN Studies on Vi antigen. II. Purification of Vi antigen from Escherichia coli 5396/38. J.Immunol. 69, 135 (1952)

WEIL,E., A.FELIX Über den Doppeltypus der Rezeptoren in der Typhus-Paratyphus-Gruppe. Z.Immun.-Forsch. 29, 24 (1920)

WESTPHAL,O.,O.LÜDERITZ,F.BISTER Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. Z.Naturforsch. 7 b, 148 (1952)

WHITESIDE,R.E., E.E.BAKER The Vi antigens of the enterobacteriaceae. II.Immunologic and biologic properties. J.Immunol. 83, 687 (1959)

WILDFÜHR,G. Über das Auftreten von Vi-Agglutininen im Serum aktiv gegen Typhus schutzgeimpfter Personen. Z.Immun.-Forsch. 108, 85 (1951)

Ich bedanke mich sehr bei Herrn Professor Dr.med. R.E.Bader für die Überlassung des Themas, für die guten Arbeitsbedingungen im Laboratorium und für die Benutzung der reichen Institutsbibliothek. Mein Dank gilt auch den med.techn.Assistentinnen des "Cheflabors" für mannigfaltige wertvolle Hinweise in allen technischen Fragen während der Durchführung der Arbeit.

L e b e n s l a u f

Am 4. November 1937 wurde ich, Ludwig Ferdinand Kern, als Sohn des Kaufmannes Ferdinand Kern und seiner Ehefrau Gerda, geb. Feldgen, in Kaiserslautern geboren.

Von 1943 bis 1947 Volksschule, von 1948 bis 1957 zunächst humanistisches Gymnasium, später neusprachliches Gymnasium in Kaiserslautern, an dem ich die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommer des gleichen Jahres begann ich in Tübingen mein Medizinstudium, welches mich nach dem Physikum 1960 an die Universitäten von Kiel, Berlin und wiederum nach Tübingen führte. Medizinalassistent war ich an der Universitäts-Hautklinik Tübingen, an der Chirurgischen Abteilung des Karl-Olga-Krankenhauses Stuttgart, an der II. Medizinischen Universitätsklinik München und an der II. Universitäts-Frauenklinik München.

Nach der Approbation vom 28. Februar 1967 genügte ich als Truppenarzt bei der Bundeswehr meiner Wehrpflicht. Seit Juni 1968 strebe ich die Ausbildung zum Facharzt für Dermatologie an der Universitäts-Hautklinik in Tübingen an.